

平成 23 年度 修士論文

間葉系幹細胞の増殖・分化に及ぼす
Niche の影響

三重大学大学院工学研究科
博士前期課程分子素材工学専攻
堀井貴司

1.緒言	1
1-1.再生医療	
1-2.幹細胞	
1-2-1.胚性幹細胞と体性幹細胞	
1-2-2.間葉系幹細胞	
1-3.間葉系幹細胞の分化	
1-3-1.上皮分化	
1-3-2.分化判定	
1-3-2-1.表面抗原	
1-3-2-2.転写因子とタンパク質発現	
1-3-2.分化制御	
1-3-2-1.生物学的因子	
1-3-2-2.物理学的因子	
1-4.幹細胞 niche	
1-5 .細胞外マトリックス(ECM)	
1-5-1.エラスチン	
1-5-2.コラーゲン	
2.目的	10
3.方法	11
3-1.細胞培養と増殖・分化判定	
3-1-1 細胞培養	
3-1-2.増殖能の判定	
3-1-2-1.増殖定数の算出	
3-1-2-2.接着率の算出	
3-1-3.分化能の判定	
3-1-3-1.脂肪分化誘導	
3-1-3-2.Oil red O 染色	
3-1-3-3.免疫蛍光染色	
3-1-3-4.陽性細胞数の算出	
3-2.ECM コーティングディスク上培養試験	
3-2-1.各種タンパク溶液の調製	
3-2-2.ECM コーティングディスク作製	
3-2-3.培養サンプルと培養条件	

3-3.ECM ゲル上培養試験	
3-3-1.ECM ゲル作製	
3-3-2.培養サンプルと培養条件	
3-3-3.細胞面積の測定	
3-3-4.圧縮弾性率測定	
3-4.統計分析	
4.結果	16
4-1.ECM コーティングディスク上培養試験	
4-1-1.増殖定数と接着率の算出	
4-1-2.Oil red O 染色による分化判定	
4-2.ECM ゲル上培養試験	
4-2-1.細胞形態と細胞面積	
4-2-2.増殖定数と接着率の算出	
4-2-3.免疫蛍光染色による分化判定と陽性細胞率の算出	
4-2-4.ゲル濃度の違いによる圧縮弾性率	
5.考察	23
5-1.ECM コーティングディスク上培養試験について	
5-1-1.elastin A と E	
5-1-2.type I collagen と elastin	
5-2.ECM ゲル上培養試験について	
5-2-1.ゲル上での cytokeratin-18 の発現について	
5-2-1-1.足場の厚さの影響	
5-2-1-2.足場の硬さの影響	
5-2-1-3.細胞形態の影響	
5-2-1-4.ECM (collagen)の影響	
5-3.ゲル上培養での上皮系分化に対する展望	
5-3-1.足場の物理的特性	
5-3-2.足場の化学的特性	
6.結論	32
7.参考文献	33
8.謝辞	37

9. Appendix 38

- 9-1. 各種溶液の調整
- 9-2. 細胞培養
- 9-3. 脂肪分化誘導
- 9-4. Oil red O 染色
- 9-5. 免疫蛍光染色
- 9-6. ECM コーティングディスクの作製法
- 9-7. ECM ゲルの作製法
- 9-8. 圧縮弾性率測定法

1. 緒言

1-1.再生医療

組織が損傷などにより失われた場合や病気により機能しなくなった場合に対する治療法としては、臓器移植や人工臓器などを利用しているが、ドナーの不足や、人工臓器機能の再現に限界があるといった問題を抱えている。そこでヒトの体細胞を用いて修復・再生する再生医療が注目されている。再生医療では、ヒトの体細胞が持つ自己修復能力のメカニズムを解明し、応用することにより、拒絶反応や後遺症の回避など、生体への負荷を最小化にするとともに、より自然な状態での修復の実現を図ることを目標としている¹⁾。

1-2.幹細胞

幹細胞とは自己複製能と分化した細胞を作る能力を併せ持った細胞であり、数々の臓器で幹細胞の存在が知られている²⁾。血液、皮膚、腸上皮、生殖器などの細胞はいったん分化し成熟すると、それぞれ定まった寿命をもって死滅し、固体の寿命と比較すると極端に短い寿命しかもたない。これを補給するために、未分化の幼若細胞が新たに増殖、分化し、成熟して定常状態を保っている。このような幼若、未分化の親細胞を幹細胞と呼ぶ。

1-2-1.胚性幹細胞と体性幹細胞

幹細胞は大きく胚性幹細胞(ES細胞:embryonic stem cell)と体性幹細胞(somatic stem cell)の2つに分類できる。ES細胞は発生初期のごく限られた間だけ存在する多能性をもつ幹細胞を取り出し、*in vitro*で培養できるように株化したものである。初期胚中の多能性幹細胞と同様に固体を構成する全ての細胞に分化する能力を保持したまま事実上無制限に増やすことが出来る³⁾。またその幅広い分化能を利用し、特定の組織を分化誘導する技術が確立できれば、様々な疾病に対して応用が可能であると期待されている。しかし、ES細胞を樹立する際の初期胚の破壊に対する倫理的問題や臓器移植と同様、拒絶反応などといった課題もある。一方、体性幹細胞は、組織幹細胞とも呼ばれ、ES細胞ほどの全能性はないが、多分化能をもち、組織を形成する様々な機能細胞の増殖、分化、成熟を行い、定常状態を保っている。

1-2-2.間葉系幹細胞

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell:MSC)は自己複製能と骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、靭帯細胞などの間葉系組織への多分化能を有する中胚葉由来の体性幹細胞である²⁾。成体組織では真皮、骨格筋、脂肪組織などの結合組織や主に骨髄間質に存在し、結合組織の修復や恒常性の維持、造血幹細胞の増殖や分化の制御に機能している。骨髄間質には骨芽細胞や脂肪前駆細胞などの間葉系前駆細胞が存在することから、特異的な表面マーカーによる解析やPercollを用いた密度勾配遠心により密度1.073g/mlの細胞を回収⁴⁾することで間葉系幹細胞を分離できることが報告されている。

間葉系幹細胞は多種の細胞への分化能を有するが、軟骨細胞・骨芽細胞・脂肪細胞への分化誘導に関して特に多くの研究報告がされている。10%血清、デキサメタゾン、 β -グリセロリン酸、アスコルビン酸を加えると骨芽細胞²⁾、デキサメタゾン、1-メチル-3-イソブチルキサンチン、インスリン、インドメタシンを添加すると脂肪細胞へ分化誘導できる。また遠心によりペレット状にし、無血清下でTGF- β を作用させると軟骨細胞に、分化誘導することができる²⁾。また近年では外胚葉由来である神経細胞や上皮細胞への分化誘導も報告^{4,5)}されていることから、更なる治療への応用の幅が期待されている。

1-3.間葉系幹細胞の分化

1-3-1.上皮分化

上皮と間葉の関係は腎臓の発生において観察されている。その発生段階において前腎、中腎、後腎という3つの腎臓が存在し、その中でも後腎が最終的な腎臓となる。腎臓の基本的な構造単位はネフロンと呼ばれる腎小体とそれに付随する尿細管との集合管から成る。後腎においてからネフロンが形成される過程において間葉から上皮への分化が観察されている⁶⁾。

In vitro においてはM.Brzoskaらが脂肪から単離したMSCにビタミンAの誘導体であるレチノイン酸(ATRA)を添加することにより、上皮系細胞に特異的なcytokeratin-18の発現が上昇し細胞形態にも変化を生じたと報告している⁵⁾。また当人の次の研究において、尿細管上皮細胞を培養した培養液(conditioned medium)をMSCの培地として利用することでまたも上皮系細胞への分化が確認されている⁷⁾。

1-3-2.分化判定

現在、間葉系幹細胞から様々な細胞への分化は、それぞれの細胞に特異的な転写因子やタンパク質の発現、表面抗原などを測定することで判定されている。しかし、間葉系幹細胞の同定ははっきりしていないのが現状である。

1-3-2-1.表面抗原

CD(Cluster of Differentiation)分類とは、ヒト白血球を主とした様々な細胞表面に存在する分子(表面抗原)に結合するモノクローナル抗体の分類である。白血球やその他の細胞は、細胞表面に糖タンパクなどでできた様々な分子を発現しており、この分子の違いを見分けることで細かい細胞の違いを識別することができる。これらの分子は、モノクローナル抗体が結合する抗原として識別することができ、表面抗原・表面マーカーと呼ばれる。そしてこれは間葉系幹細胞の同定にも応用されており、現在、CD14、CD29、CD34、CD44、CD45、CD106、SH2、SH3、STRO-1 などにより解析されている^{8,9)}。

1-3-2-2.転写因子とタンパク質発現

間葉系幹細胞の分化にはそれぞれ異なった転写因子が必要になってくる¹⁰⁾。そのため分化の判定にはこの転写因子やそれによるタンパク質の発現を調査することで行われている。骨、脂肪、軟骨への分化についてしばしば報告されていることについては述べたがこれらを例にすると、全く異なるファミリーに属する転写因子がその分化を規定していると考えられており、転写因子を基にした分化制御機構が次第に明らかとなっている。分化判定に用いられている転写因子とタンパク質の例を以下の表にまとめた。

細胞種	転写因子とタンパク質
骨芽	Rnux2,Osterix,AlkalinePhosphatase
脂肪	PPAR γ 2
軟骨	Sox9,type II collagen
筋系	MyoD
上皮系	Cytokeratin
神経系	GFAP,MAP2

表 1-1.細胞特異的転写因子とタンパク質^{4,7,11,12,13)}

1-3-3.分化制御

1-3-3-1.生物学的因子

細胞は本来、生体内で細胞に特異的な細胞外マトリックス(ECM)で三次元的に埋められており、これらの影響も受けて増殖や分化の制御が成されていると考えられる。現在、この ECM を中心とした足場を生物学的因子として用いる研究が進められている。

細胞と基質の間の接着には、接着分子インテグリンとその裏打ちタンパク質群が集積した焦点接着(focal adhesion)と呼ばれる斑点状の接着構造が多く見られる。インテグリンに結合できる基質分子は複数あることが多く、結合する基質分子によって異なる接着シグナルを細胞内に伝達すると考えられている。間葉系幹細胞における ECM 刺激の場合、多くのインテグリン裏打ちタンパク質群の中で focal adhesion kinase(FAK)が活性化することが知られており¹⁴⁻¹⁶、その後、MAPK 経路を通り骨分化などが促進されることが報告されている¹⁴。

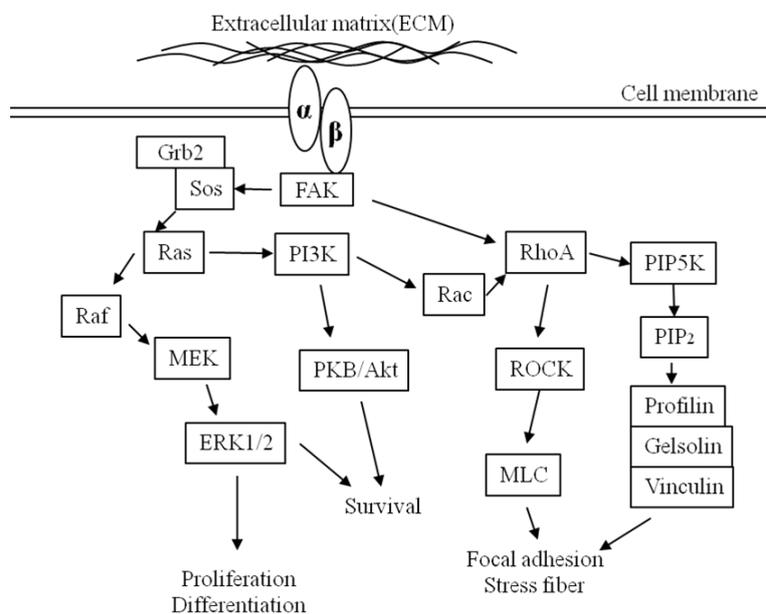


図 1-1.生物学的因子によるシグナル伝達^{15,16}

1-3-3-2.物理学的因子

幹細胞の分化制御には物理学的因子も重要である。これまで無重力環境下での培養による MSC の骨分化の抑制などが報告されている¹⁷⁻¹⁹。また培養足場の硬さ、つまり足場の弾性による制御にも注目が集まっている。生体の各組織はそれぞれ特有の弾性を持っている。そのため MSC を適切な弾性の足場によって培養することで、特異的な分化系統の特定や効率的な培養方法の確立、またそれらのメカニズムの解明につながると考えられている。

現在、弾性の異なる足場で MSC を培養することで分化系統が異なることが報告されている²⁰⁾。細胞が足場の弾性を認識する機構については調査されている段階であるが、細胞と足場の接着とそれによる細胞骨格の収縮、伸長が関係していると言われている。細胞の接着には上記で触れた通りであり、その接点(接着斑)に細胞が収縮、伸長する際の収縮力が伝わると足場から反力が生じる^{21,22)}。これにより細胞は足場の弾性を認識することで細胞が増殖、分化、移動といった細胞活動を引き起こしていると考えられている^{20,23)}。

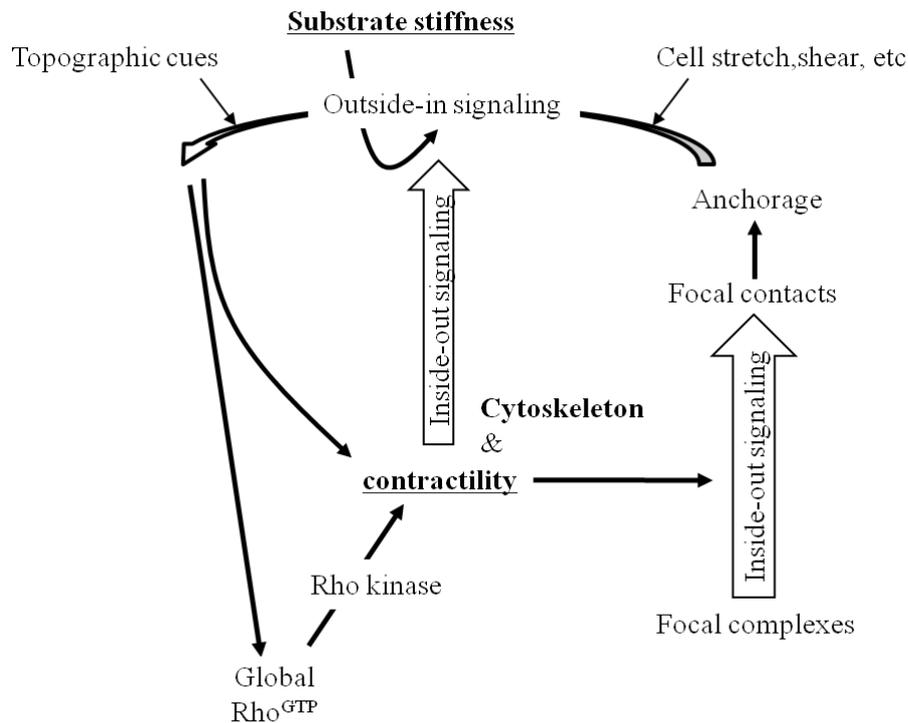


図 1-2. 足場の硬さによる細胞収縮に関する情報伝達²⁴⁾

1-4. 幹細胞 niche

幹細胞 niche とは、各組織の幹細胞が自己複製或いは維持されるための幹細胞を支持する微小環境である。つまり幹細胞が未分化な状態を維持するか、それとも分化していくのかを決定している場所であると言い換えることができる。本研究に用いた間葉系幹細胞を始め、造血幹細胞など生体内には様々な組織に多種の幹細胞が存在している²⁾。大部分の幹細胞は定常状態では、細胞周期上の休止期と呼ばれる状態にある。そして必要に応じて増殖・分化を起こしている。つまり *in vitro* において幹細胞の制御を行うことを目的とした場合には、この niche の再現又は模倣が重要な考え方、方法となり得る。現在幹細胞 niche の因子として、そこに存在する幹細胞は元より、それ以外には次のような 3 つのことが考えられている²⁵⁾。

- 1) 液性因子 …… 幹細胞周辺に存在するサイトカインや pH など
- 2) 細胞外マトリックス(ECM) …… 幹細胞が接着している細胞外マトリックス
- 3) niche 細胞 …… 幹細胞の周囲或いは接着してそれを支持している細胞

これらの因子が複雑な関連性を持ち、それぞれが単独ではなく複合して幹細胞と相互作用することにより幹細胞を維持、つまり幹細胞らしさ(stemness)を保つことで組織の恒常性を保っている。

これまでの研究から様々な幹細胞についてその niche である微小環境が明らかになりつつある。本研究に用いた間葉系幹細胞は骨髄由来であるため骨髄内の環境とそこでの幹細胞について述べる。

骨髄は骨内部を埋める柔組織であり、その中には主に血液系と間葉系の 2 種類の細胞が含まれている。そしてそれぞれの系統の親細胞である造血幹細胞と間葉系幹細胞が存在している。細胞外マトリックスは間質細胞が産生していると考えられている。

血球系細胞	造血幹細胞、赤血球、白血球、好中球、単球 など
間葉系細胞	間葉系幹細胞、間質細胞、脂肪細胞 など
細胞外マトリックス	I、III、IV、V型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、シンデカン、パーリカン、ビグリカン、ヒアルロン酸 など

表 1-2.骨髄内の細胞種と細胞外マトリックス²⁶⁾

骨髄中の幹細胞 niche は造血幹細胞(HSC)について研究が進んでいる。HSC は骨内膜表面の骨芽細胞や ECM 成分と結合していると考えられており、これらによりその性質を維持している。その ECM 成分の中で機能が報告されているのはオステオポンチンである。オステオポンチンは骨基質糖タンパクであり骨芽細胞によって産生されている。そして HSC 表面の CD44 レセプターと結合することで休止期の維持や増殖抑制に対して影響を与えている²⁷⁻²⁹⁾。それ以外にもヘパラン硫酸プロテオグリカンが HSC の niche に関与していると言われている^{27,30)}。

またこの他の幹細胞においても ECM は重要な働きを担っていると考えられており、Jensen や Zhu らによって表皮幹細胞において、ECM 成分と結合する β_1 インテグリンが幹細胞の制限に対して影響を及ぼすことや同じく β_1 インテグリンがニューロン幹細胞の増殖、生存、遊走を制御していることが示されている^{31,32)}。インテグリンは ECM と細胞の結合に必要な膜貫通型タンパク質であるため、インテグリンの発現は ECM の重要性を示すことになる。

これらの報告のように **niche** における **ECM** は幹細胞の維持に対して重要であり、またそれだけではなく、三次元構造による物理的特性や化学的因子の保持などにも関与している。

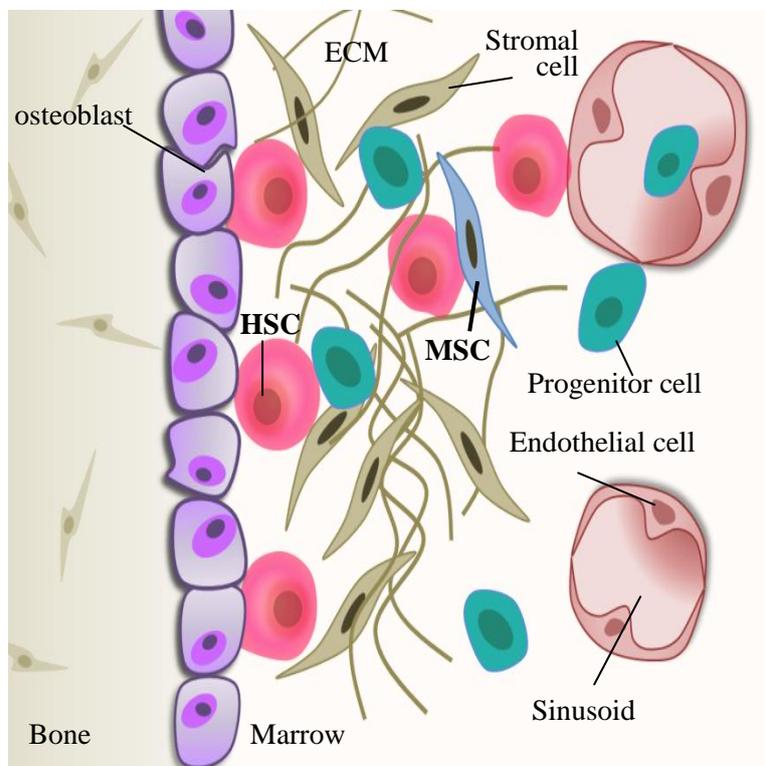


図 1-3. 骨髄内の環境³³⁾

ECM 以外にも骨芽細胞と **HSC** のように **niche** 細胞による影響についても腸幹細胞、毛包上皮幹細胞などの研究で明らかとなりつつあるが、複雑な幹細胞の制御のメカニズムは完全にはわかっていない。**MSC** の骨髄中における **niche** に関しても同様にほとんどが明らかとはなっておらず、これまでに **MSC** が **HSC** の **niche** 細胞として機能していることが **Simon** らにより報告されている³⁴⁾。しかしこの報告は **MSC** が **niche** 細胞としての機能を有することを立証したものであり、**MSC** 自身に対する **niche** はいまだ不明確であると言える。

1-5.細胞外マトリックス

細胞外マトリックスとは、細胞の外側にある構造的なものの総称で、主成分はコラーゲン、エラスチンといった繊維性タンパク質、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンとプロテオグリカン、それにフィブロネクチン、ラミニンなどの細胞接着性タンパク質である。細胞外マトリックスは、脊椎動物の身体の構造要素の主体で、結合組織の主成分なので、皮膚や骨に多く含まれ、能や脊髄には少ない。従来は組織の充填材として物理的構造を保つだけと思われていたが、近年では、細胞の増殖・移動・形状・代謝・分化などの細胞活性を細胞の外側から制御する因子として注目されている。エラスチンとコラーゲンの生体組織内での分布について図 1-4 にまとめた。

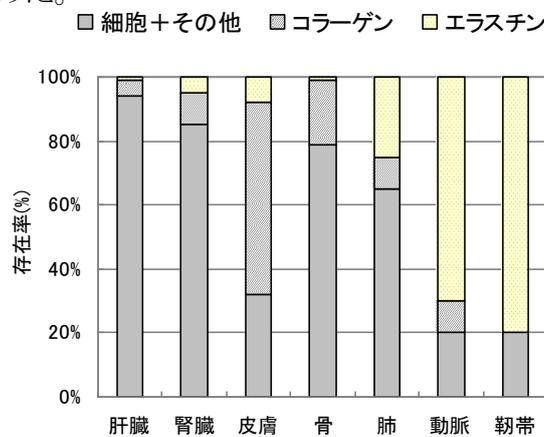


図 1-4.細胞外マトリックスの分布

1-5-1.エラスチン(Elastin)

エラスチンは弾性を有する繊維状タンパク質で、大動脈、靭帯、肺、皮膚などに多く発現している。これらの組織の弾性はエラスチンの特性に基づいている。

エラスチンは分子量が 67kDa の前駆体のトロポエラスチンがリシルオキシターゼによって架橋されている細胞外マトリックスの一つであり、組織から酸、アルカリ、アルコール等で処理後に残る不溶性タンパク質として定義される。一次構造には疎水性側鎖を含むアミノ酸が約 92%を占めており、エラスチン凝集体の収縮・弛緩により、立体構造が容易に復元できる³⁵⁾。

エラスチンはトロポエラスチンとして合成され、その後分子中に含まれるリシン側鎖に銅イオンとリシルオキシターゼが共に働き、生体内架橋反応を経て、不溶性エラスチンとして形成される。架橋構造は、トロポエラスチン中の4つのリシン側鎖から導かれた4級ピリジニウム環を含むデスモシン、イソデスモシンと呼ばれる特徴的なもので、複数のポリペプチド鎖を形成し、弾性に富んでいる。エラスチンに存在する繰り返し配列である VGVAPG 配列は細胞結合性を示し、これによってエラスチンは他の細胞外マトリックスとは異なったリガンドと接着し、機能制御に関

わっている³⁶⁾。

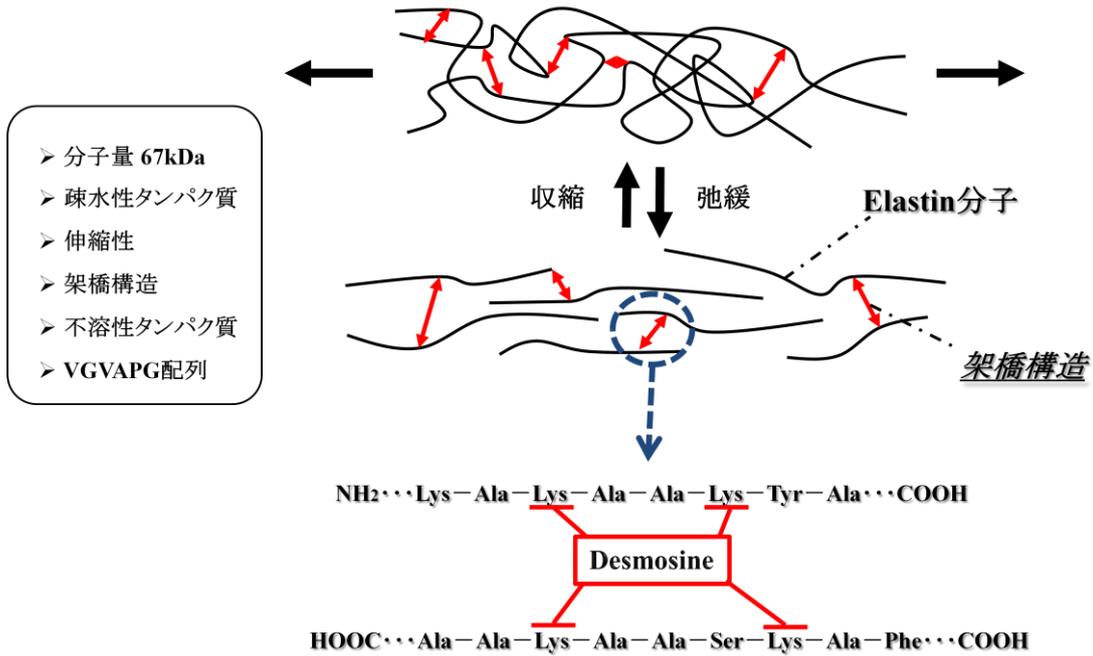


図 1-5.Elastin の構造

1-5-2.コラーゲン(collagen)

コラーゲンは体タンパク質の中で最も量が多く、総タンパク質量の3分の1に相当し、細胞の増殖や分化、遊走といった細胞の活動を調節している。コラーゲンは分子量約 10 万 kDa のポリペプチド鎖 3 本から成る三重螺旋構造(triple helix)をとったもので、1 分子当たり分子量は約 30 万 kDa、長さは約 300nm、太さは約 1.5nm となる。コラーゲンのアミノ酸組成はグリシンが約 3 分の 1 を占めるが、これはコラーゲン分子が“-Gly-X-Y-”の繰り返し構造(X にはプロリン、Y にヒドロキシプロリン)を多数持つポリペプチドから出来ていることによる。アミノ酸配列が異なるコラーゲン分子が 20 種程知られており、組織特異的に分布している。例えば、皮膚・腱・骨などには I 型コラーゲンが多く、軟骨はほとんどが II 型コラーゲンである³⁵⁾。

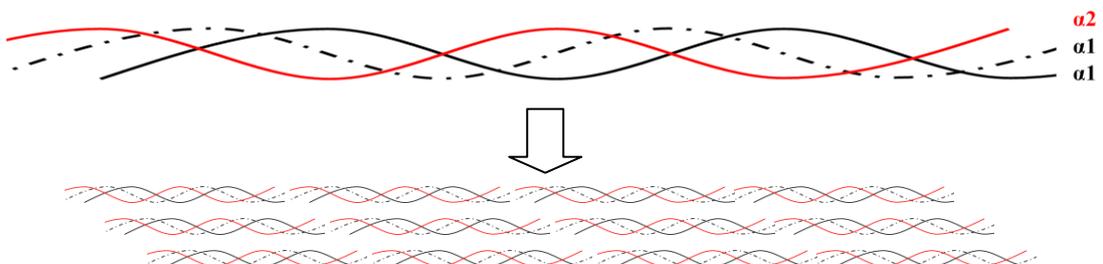


図 1-6.コラーゲンの螺旋構造と自己凝集

2.目的

以前の研究から間葉系幹細胞は培養を続けることで骨分化していく傾向が示された³⁷⁾。このように間葉系幹細胞の実用化には *in vitro* での未分化を維持した増殖や適切な分化誘導を行う必要がある。そのためには幹細胞 niche、つまり幹細胞周囲の環境を調節することが必要であるといえる。

本研究の目標は細胞外マトリックス(ECM)が間葉系幹細胞へ及ぼす影響を調査することである。ECM の存在の有無による比較だけではなく、ECM の種類やその物性にも注目をし、それらの違いが及ぼす影響を調査することで *in vitro* での間葉系幹細胞の培養技術の確立を目指している。

3.方法

(詳細は9章 Appendix 参照)

3-1.細胞培養と増殖・分化判定

3-1-1.細胞培養

本研究に使用した細胞は理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室より購入した研究用ヒト間葉系幹細胞を用いた。

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell:MSC)は、5000cells/cm² で播種し、DMEM+10%FBS+3ng/ml bFGF の培地を用いて培養し、10% Trypsin/PBS を使用して継代した。継代は sub-confluent にまで増殖した際に行い、初めに播種した代を passage 1(P=1)として定義した。P=2-5 を実験に使用した。培養条件は37°C/5%CO₂ でインキュベート、3日に1回培地交換を行った。

3-1-2.増殖能の判定

3-1-2-1.増殖定数の算出

間葉系幹細胞の増殖は位相差顕微鏡により撮影した細胞の写真(倍率 100倍)から細胞数をカウントすることで判定した。増殖定数は細胞数をプロットすることで得られた指数近似曲線を対数変換したグラフの傾きとした(図 3-1)。

3-1-2-2.接着率の算出

細胞の接着率は指数近似曲線のグラフから算出した(定数 b)。その細胞数を播種した細胞数で割ることで割合を算出した(図 3-1、式 3-1)。表記はパーセントとなっている。

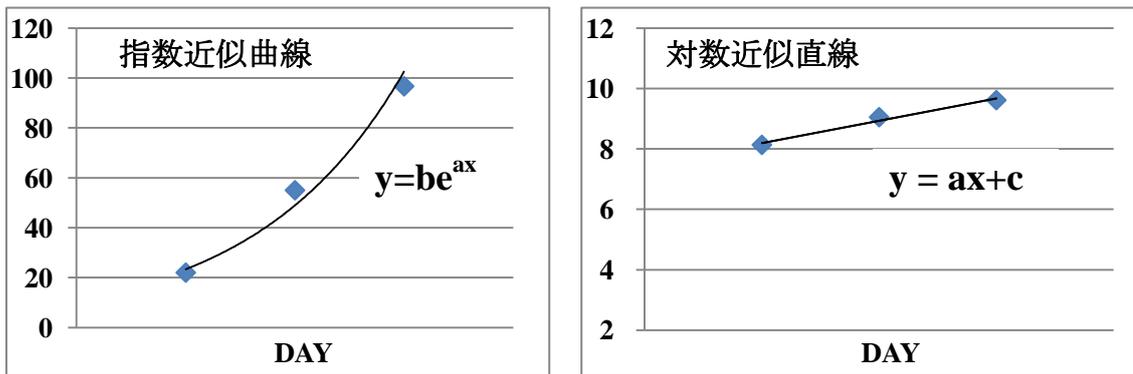


図 3-1.近似グラフ a: 増殖定数 b: 写真1枚当たりの初期接着細胞数[cells]

$$\text{接着率[\%]} = \frac{\text{写真1枚当たりの初期接着細胞数} \times 154.9 \text{ [cells]}}{\text{播種した細胞数}(1.8\text{cm}^2 \times X\text{cells/cm}^2) \text{ [cells]}} \times 100$$

式 3-1.接着率の算出式

3-1-3.分化能の判定

3-1-3-1.脂肪分化誘導

間葉系幹細胞を密度 5,000cells/cm²で 24 穴プレートに播種し、5 日間培養した。その後 DMEM に 10% FBS、10% indomethacin、10% 3-isobutyl-1-methylxanthine、1% insulin、0.1% dexamethasone を加えた培地に切り替え、さらに 14 日間培養した。

3-1-3-2.Oil red O 染色

間葉系幹細胞の脂肪への分化は Oil red O 染色により判定した。サンプルを PBS により洗浄した後、10%ホルムアルデヒド (064-00406/Wako)/PBS により固定した。60%イソプロパノールを添加し静置した後、調整した Oil red O 染色液を加えて静置した。染色液を吸引後、60%イソプロパノールを加えて静置し、PBS で洗浄後、PBS 中で顕微鏡により検鏡した。

3-1-3-3.免疫蛍光染色

本研究で使用した細胞もタンパク質発現は免疫蛍光染色を用いて検出した。培養後 7 日目と 14 日目のサンプルを 4%パラホルムアルデヒドにより室温で固定を行った後、PBS により洗浄した。0.1% Triton X-100 で浸透処理をした後、PBS によって 3 回洗浄を行った。非特異性結合部位は 1% BSA/PBS 溶液によりブロッキングし、一次抗体 Anti-Cytokeratin 18 phospho Ser52, Rabbit (SC-17032-R/コスモバイオ)を希釈倍率 1:200 で添加し 4°Cで overnight させた。

一次抗体を取り除き、1% BSA/PBS により 3 回洗浄をした後、二次抗体 Goat anti-Rabbit IgG, (H+L) FITC conjugate (AP307F/MILIPORE)を希釈倍率 1:200、核染色に PI (P4170-25MG/Sigma)を希釈倍率 1:200 で添加し、共焦点顕微鏡(FV1000/Olympus)にて検出した。

3-1-3-4.陽性細胞数の算出

共焦点顕微鏡像より Cytokeratin-18 陽性細胞数をカウントし、陽性率を算出した。細胞数は PI を基にカウントし、その中で蛍光を示している細胞を陽性細胞としてカウントした。陽性細胞数を全細胞数で割ることで求めた。表記はパーセントとした。

3-2.ECM コーティングディスク上培養試験

3-2-1.各種タンパク溶液の調製

•type I collagen 溶液

本研究室で抽出した type I collagen を濃度 0.5mg/ml となるように pH3.0 の希塩酸に溶解し、0.22 μ m のフィルターで濾過滅菌した。その後凍結乾燥により精製した滅菌済み type I collagen を濃度 3.0mg/ml に希塩酸で調整し、以下の実験に使用した。

•Elastin 溶液

本研究室で抽出した Elastin を濃度 1.0mg/ml となるように滅菌水に溶解し、0.22 μ m のフィルターにより濾過滅菌した。その後凍結乾燥により精製した滅菌済み Elastin A を最終濃度 3.0mg/ml に調整し、以下の実験に使用した。

3-2-2.ECM コーティングディスク作製

3-2-1 で調整した溶液を使用し type I collagen、elastin A、elastin E のコーティングディスクを作製した。セルディスク(MS-92132/住友ベークライト)にコロナ放電を用いて前処理を行った後、それぞれの ECM 溶液に浸し、5 時間静置した。これをコーティングディスクとして実験に用いた。

3-2-3.培養サンプルと培養条件

P2-4 の間葉系幹細胞を 24 well plate に密度 1,000 と 5,000cells/cm² で播種し、この日を 0day とした。試験培地には DMEM + 0.5% FBS を使用した。14 日間培養を行い、増殖定数と接着率の算出を行った。また脂肪分化誘導を行い Oil red O 染色により分化能を判定した。コーティングディスクを使用していないサンプルを control とし、各種コーティングディスクを使用したものの表記は以下に示した。



図 3-2.培養フロー

表記	培地	コーティング
control	DMEM + 0.5% FBS	
with bFGF	DMEM + 0.5% FBS + 3ng/ml bFGF	
Col. I	DMEM + 0.5% FBS	type I collagen
Ela. A	DMEM + 0.5% FBS	elastin A
Ela. E	DMEM + 0.5% FBS	elastin E

表 3-1.培養条件とサンプルの表記

3-3.ECM ゲル上培養試験

3-3-1.ECM ゲル作製

本実験には厚さの異なる 2 種類のゲルを調製した。以下の方法で作製したゲルの厚さはそれぞれ約 1.9mm と 100 μ m である。

3-3-1a.厚いゲル(表記:thick)

24 well plate に濃度 3mg/ml と 6mg/ml に調製した type I collagen 中和溶液を 350 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C インキュベータ内で 1 日間静置した。PBS 溶液により洗浄したものを以下の実験に使用した。

3-3-1b.薄いゲル(表記:thin)

滅菌したプレートとゲルの鋳型、セルディスクを図 3-3 のように組み立てた。セルディスク上に濃度 3mg/ml に調製した type I collagen 中和溶液を約 30 μ l 滴下し、37 $^{\circ}$ C インキュベータ内にて 1 日間静置した。その後 PBS 溶液により洗浄したものを以下の実験に使用した。

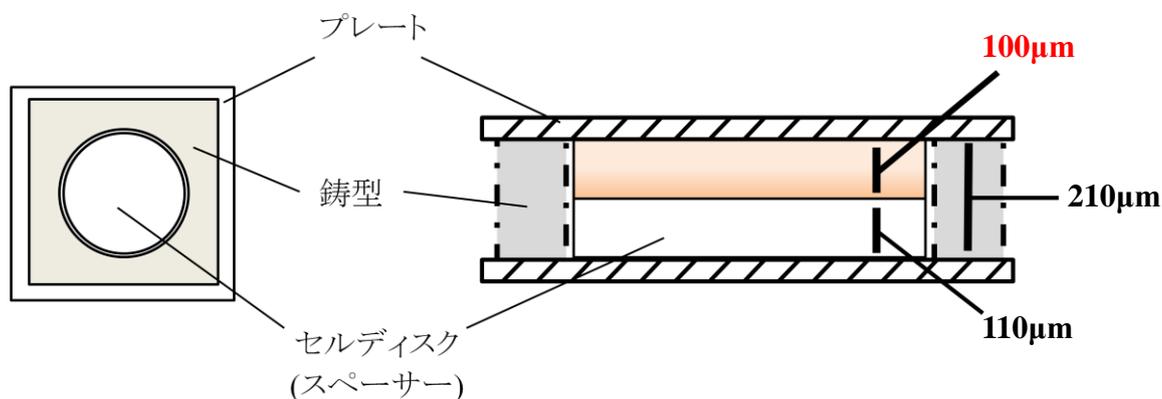


図 3-3.ゲル作製

3-3-2.培養サンプルと培養条件

P3-5 の間葉系幹細胞を密度 $1,500\text{cells}/\text{cm}^2$ で播種し、この日を 0day とした。試験培地には DMEM + 10% FBS を使用し、増殖定数と接着率の算出、免疫蛍光染色、RT-PCR を行った。type I collagen のコーティングディスク上で培養したサンプルを control として実験を行った。



図 3-4.培養フロー

3-3-3.細胞面積の測定

Control であるコーティング上の細胞とゲル上の細胞の面積を image J により測定した。結果は各条件それぞれランダムに 30 個の細胞を選択し、その平均値を記載した。

3-3-4.ゲルの圧縮弾性率測定

サンプルの自然長を測定した後、弾性率測定装置によりサンプルをリニアアクチュエーターによって圧縮させ、動歪み計測器に表示される圧縮力をアナログ計測計算機によって読み取った。弾性率を応力-歪曲線より算出した。

$$\frac{F [\text{N}] / A [\text{m}]}{\Delta L [\text{m}] / L [\text{m}]} = \text{弾性率} [\text{Pa}]$$

式 3-2.弾性率の算出式

3-4.統計分析

統計ソフトウェアは StatView®-J 5.0(SAS 社)を使用した。解析には Tukey-Kramer 法を用いた。データは平均値±標準偏差として表記し、P values < 0.05 のとき有意差があると判断した。

4.結果

4-1.ECM コーティングディスク上培養試験

4-1-1.増殖定数と接着率の算出

図 4-1a, b は播種密度 1,000cells/cm² と 5,000cells/cm² の時の各 ECM 上での増殖定数と接着率を算出した結果である。白い棒グラフが左の縦軸である増殖定数、黒い棒グラフが右の縦軸である接着率を表している。elastin A 上では増殖能が維持され、type I collagen、elastin E 上では抑制された。また接着率 elastin A において有意な減少が見られた。

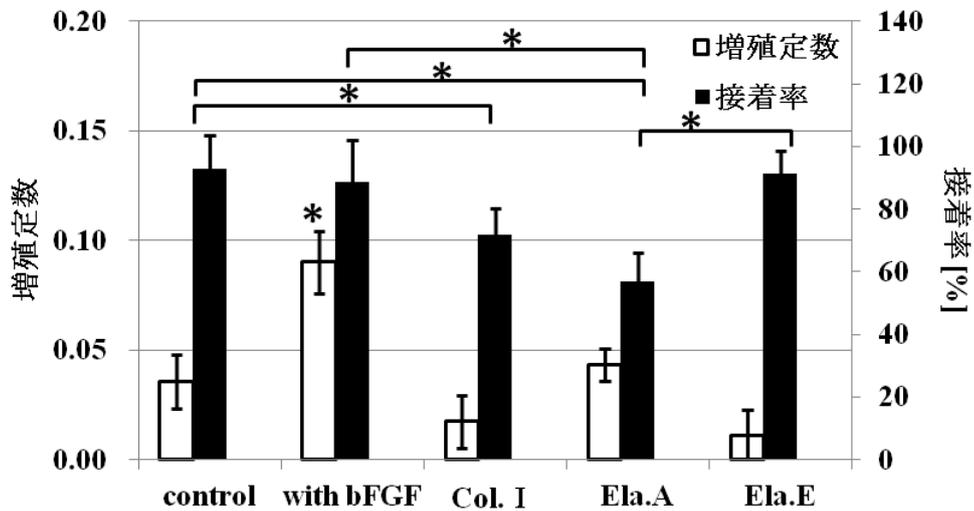


図 4-1a.増殖定数と接着率(1,000cells/cm²)

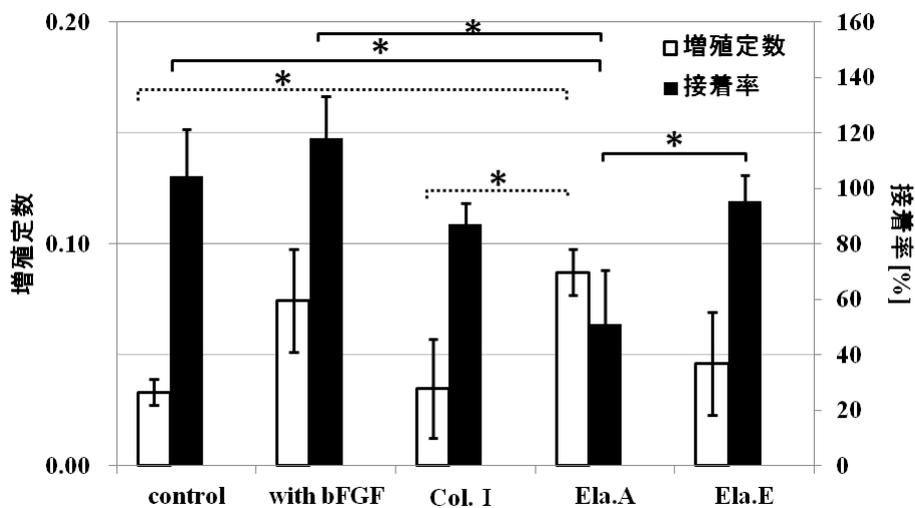


図 4-1b.増殖定数と接着率(5,000cells/cm²)

4-1-2.Oil red O 染色による分化能判定

図 4-2 は図 4-1 の各条件の下で培養した MSC の脂肪分化能を Oil red O 染色により判定した結果である。control と比較すると、type I collagen と elastin E の条件下で分化能が維持されていたことがわかった。

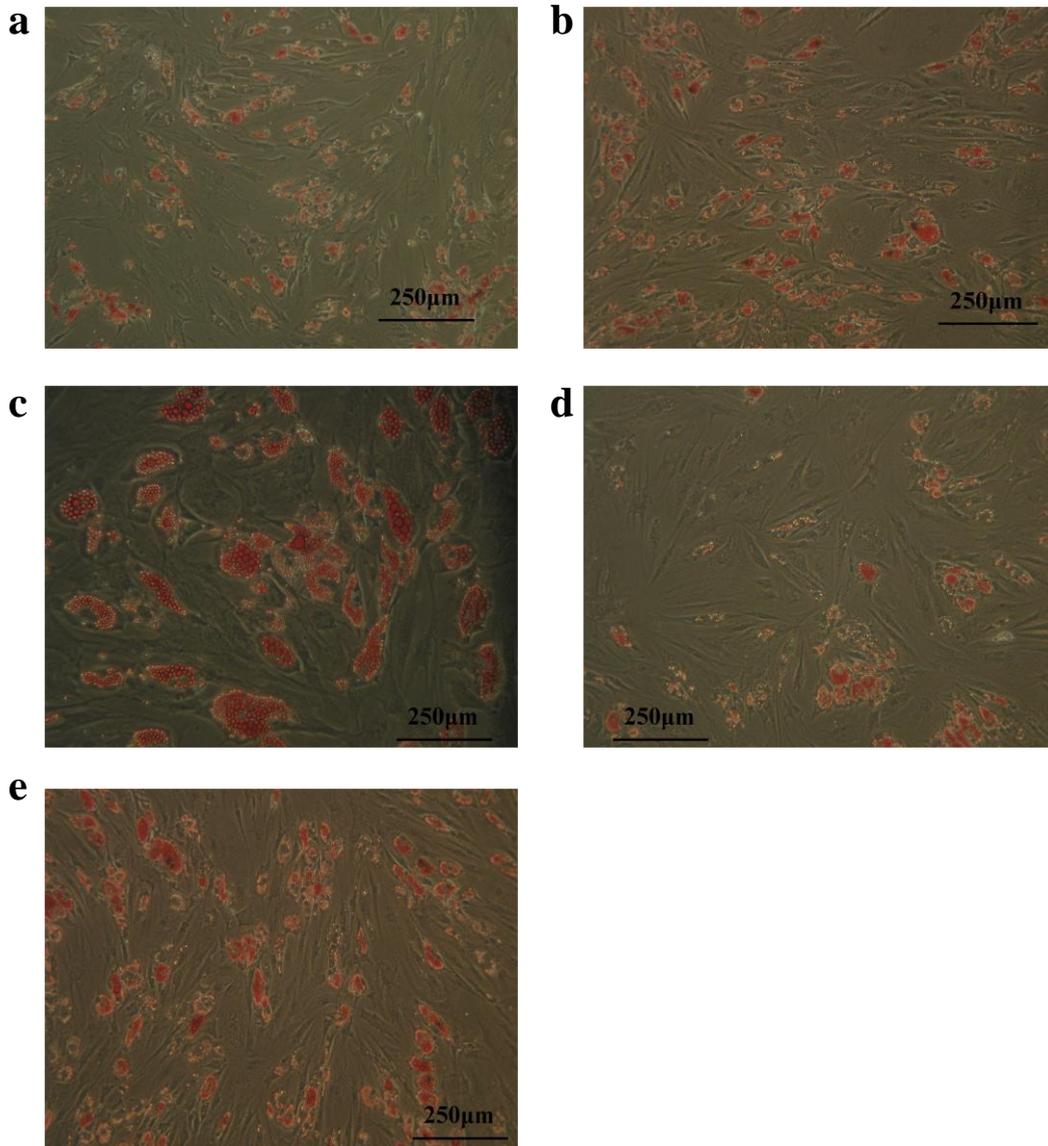


図 4-2.Oil red O 染色写真

a: control 、 b: with bFGF 、 c: type I collatgen 、 d: elastin A 、 e: elastin E

4-2.ECM ゲル上培養試験

4-2-1.細胞形態と細胞面積

図 4-3 は coating、thick ゲル、thin ゲル上での細胞形態とその細胞面積の結果である。形態写真は培養 1 日目の各条件下での位相差顕微鏡像(倍率 200 倍)を載せた。図 4-4 の細胞面積は培養 1 日目の写真から image J により測定し、グラフ化したものである。Coating 上では約 12,000、thin ゲル上で約 9,000、thick ゲル上で約 4,000 μm^2 となり、thick ゲルが細胞面積に対して有意に影響を及ぼした。

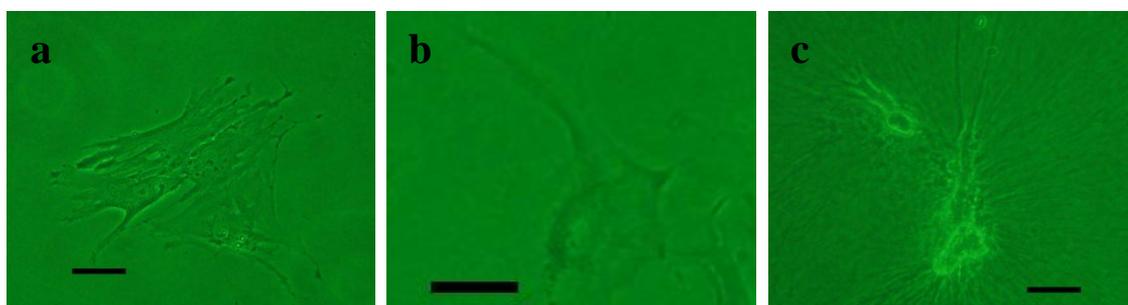


図 4-3.細胞形態

a: coating、b: thin ゲル、c: thick ゲル(scale bar: 50 μm)

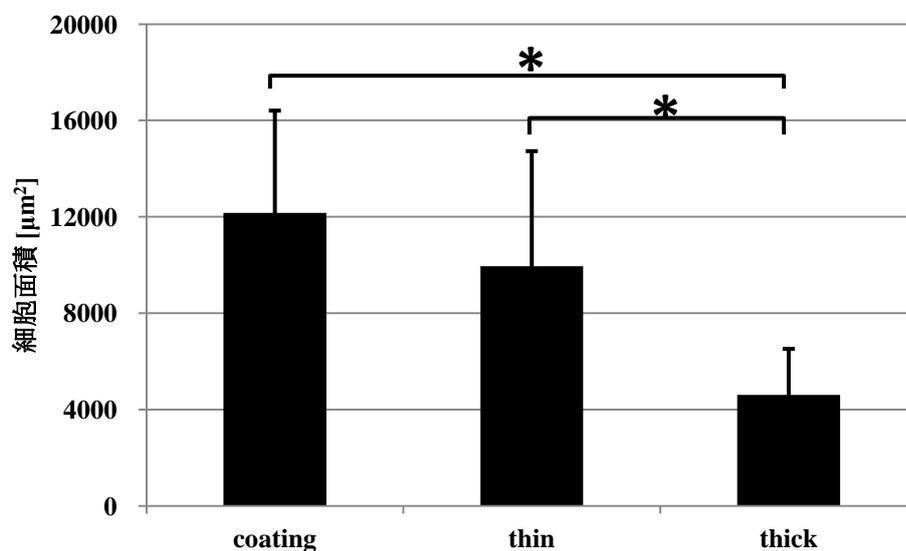


図 4-4.細胞面積

単位: μm^2 、*:Tukey-Kramer; $P < 0.05$

4-2-2.増殖定数と接着率の算出

図4-5に coating、thick ゲル、thin ゲル上での増殖定数と接着率の結果を示す。白い棒グラフが左の増殖定数、黒い棒グラフが右の接着率を表している。Thick ゲル上において増殖定数の有意な減少が確認された。また接着率に有意な差は見られなかった。

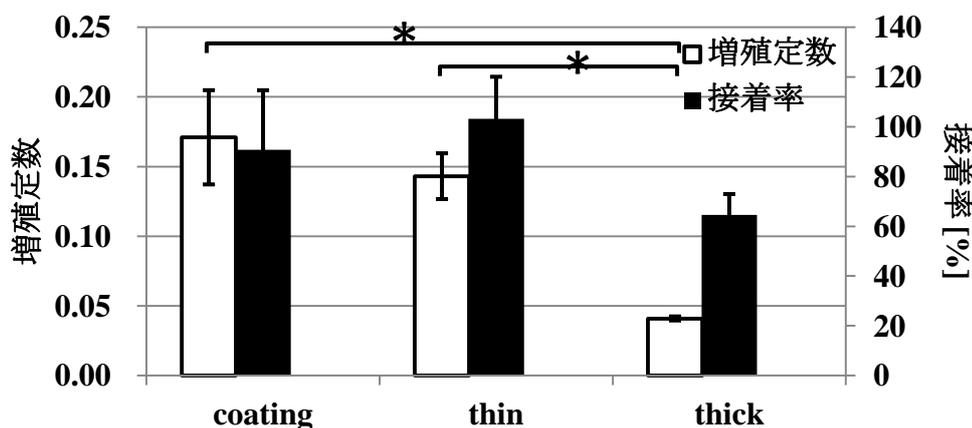
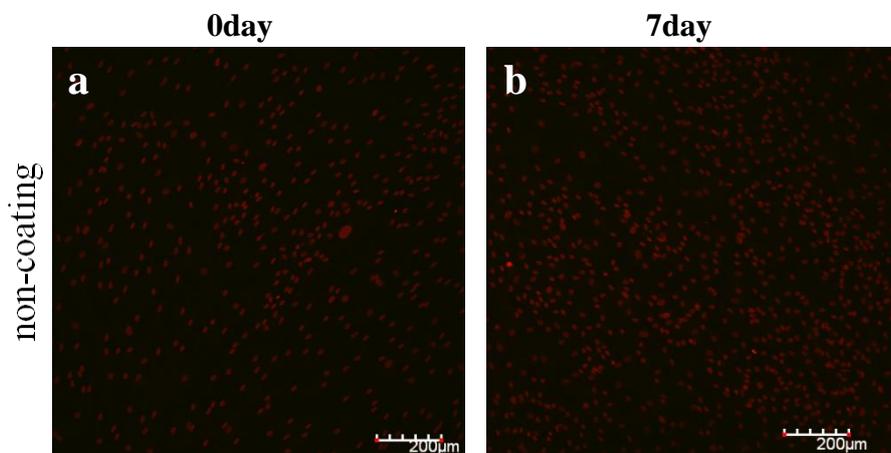


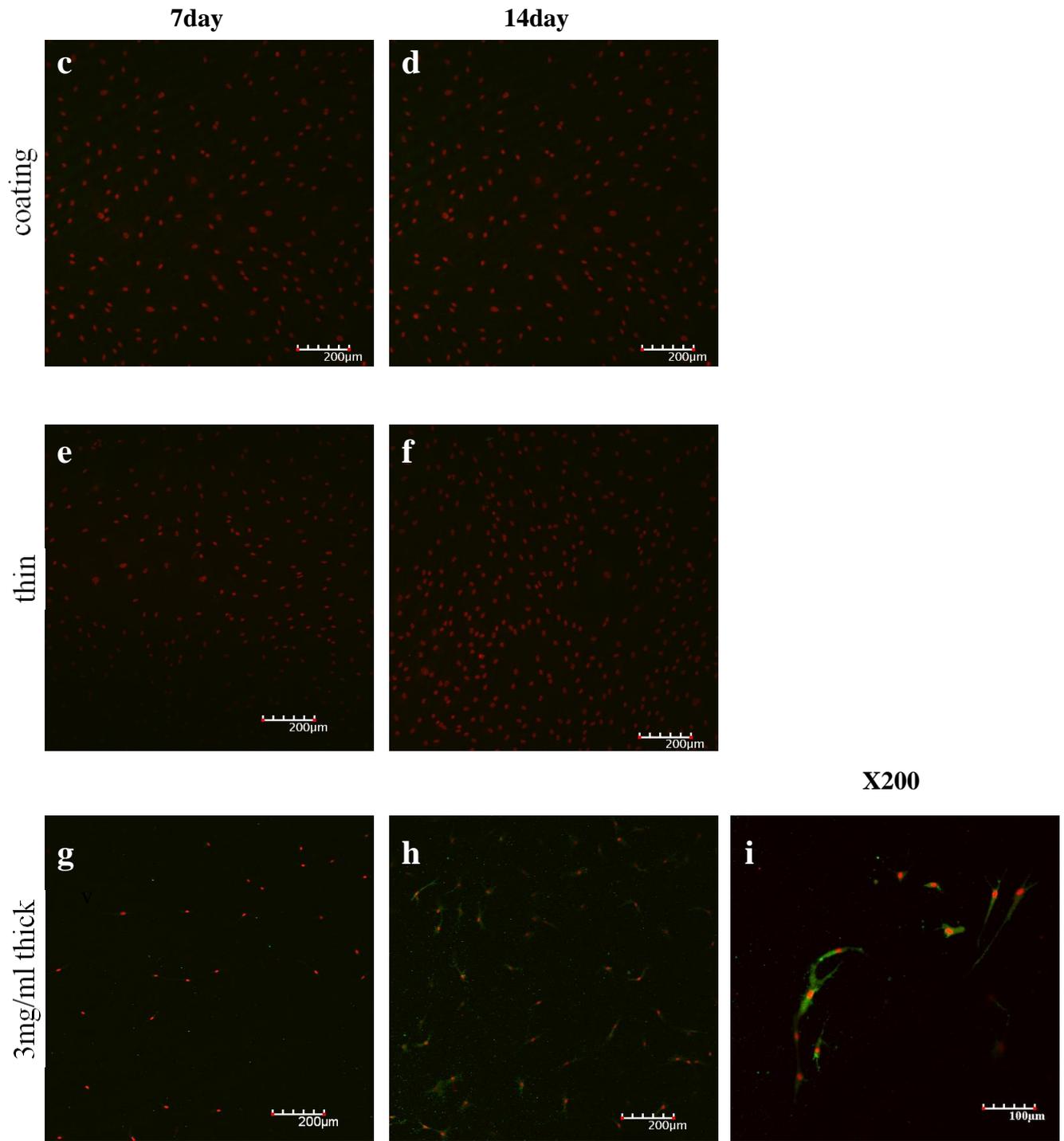
図 4-5.ゲル上での増殖定数と接着率 Tukey-Kramer;* :P<0.05 n=3

4-2-3.免疫蛍光染色による分化判定と陽性細胞率の算出

図4-6に Coating、thick ゲル、thin ゲル上と coating やゲルのないプレート上で 7 日、14 日間培養した後の Cytokeratin-18 の免疫蛍光染色結果である。Coating、thin ゲルでは 7 日、14 日それぞれで Cytokeratin-18 の発現はほとんど観察できなかった。しかし thick ゲルに関しては 7 日、14 日に関わらず発現が見られた。

さらに図4-7にこれらの染色写真から全細胞数と Cytokeratin-18 陽性細胞数をカウントすることで陽性率を算出し 7 日と 14 日のグラフをそれぞれ示した。こちらの結果からも濃度や培養日数に関わらず thick ゲルにおいて Cytokeratin-18 陽性細胞が多かったことが示された。





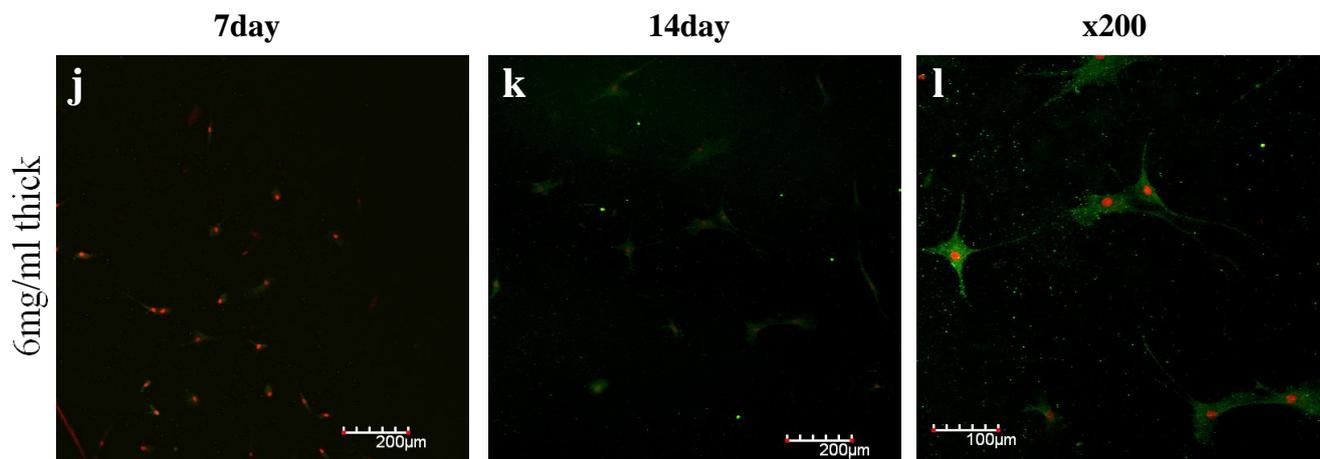


図 4-6.免疫蛍光染色による Cytokeratin-18 の発現

a,b: non-coating、**c,d:** coating、**e,f:** thin ゲル、
g-i: 3mg/ml thick ゲル、**j-l:** 6mg/ml thick ゲル

a: 0day、**b,c,e,g,j:** 7day、**d,f,h,i,k,l:** 14day

a-f,g-h,j-k: x100、**i,l:** x200 scale bar = 200µm、100µm

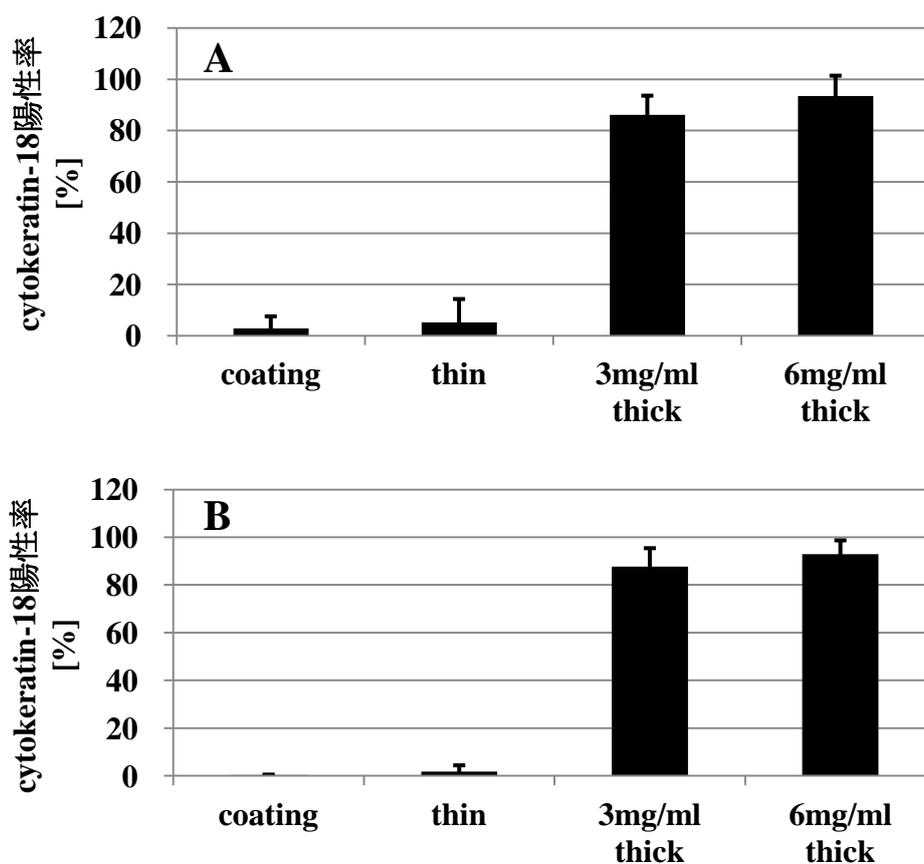


図 4-7.cytokeratin-18 陽性細胞の割合

A: 7day、B: 14day

3-3-4.圧縮弾性率測定

図 4-8 に濃度 3mg/ml と 6mg/ml のコラーゲンゲルのそれぞれの弾性率を示した。濃度を高くすることでゲルの弾性率の上昇が示された。

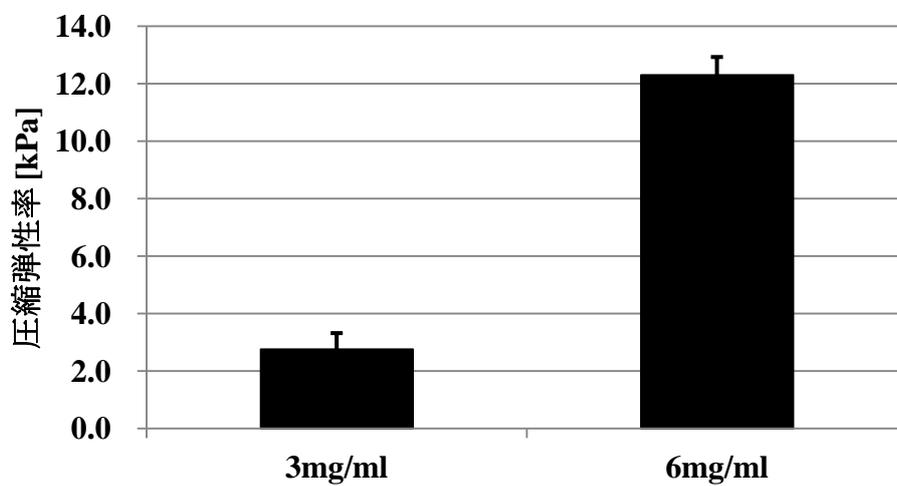


図 4-8.コラーゲンの濃度の違いによる圧縮弾性率[kPa]

5.考察

5-1.ECM コーティングディスク上培養試験

1,000cells/cm²と5,000cells/cm²に播種密度を変化させた時のそれぞれの増殖定数、接着率について control の結果を1としてECMの間で比較した結果をまとめたものを図5-1に示す。どちらの播種密度においても elastin A で増殖定数が高くなり type I collagen と elastin E では差がなかった。このことについて以下の2点について考察する。

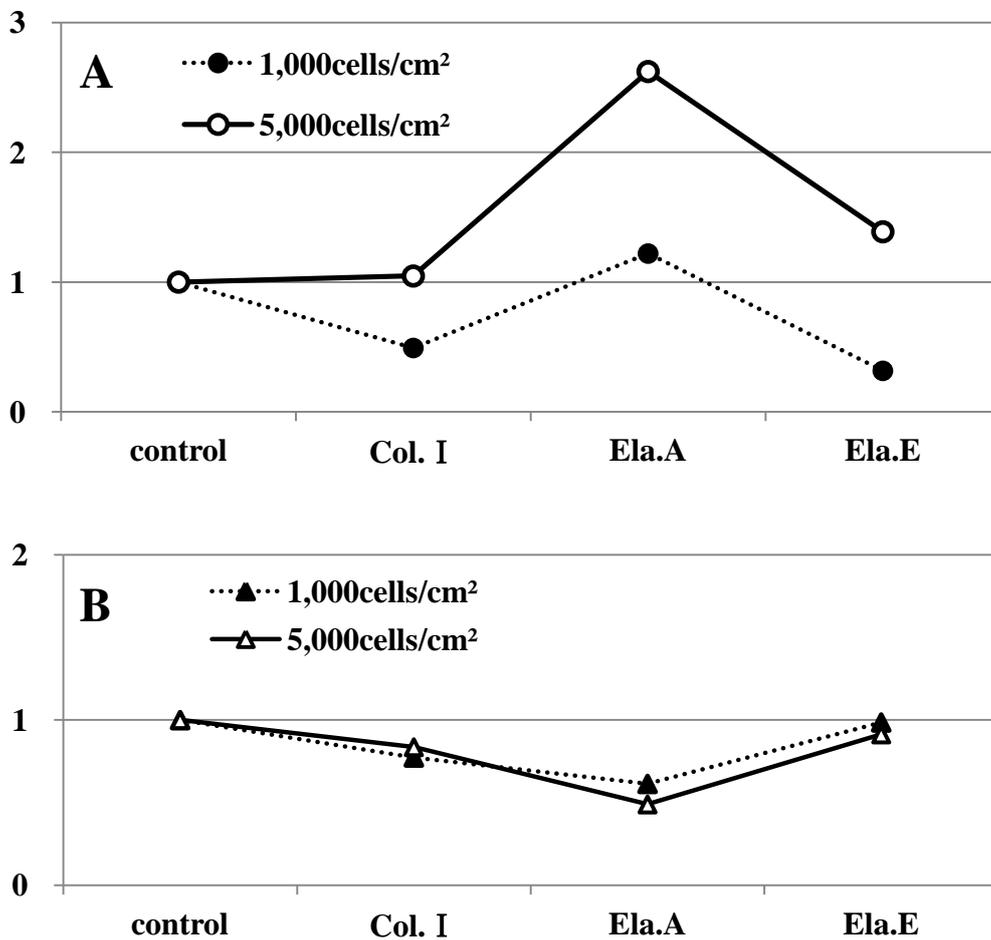


図5-1.増殖定数と接着率の比較
A: 増殖定数 B: 接着率

5-1-1.elastin A と E

結果から elastin A の方が elastin E に比べ、増殖定数が大きくなった。本研究に用いた elastin は本研究室で抽出したものを使用した。その際に抽出した elastin は凝集温度の違いなどから A から E までの 5 つに分画しており、その違いは以下に示した通りである^{38,39)}。

	凝集温度 [°C]		数平均分子量 [kDa]		デスモシン含有量 [mol%]	
Elastin A	~22.5	低	25.2	大	2.87	多
Elastin B	22.5~25	↓	21.4	↑		↑
Elastin C	25~30		18.7		2.53	
Elastin D	30~35	↓	10.3	↑		↑
Elastin E	35~50		高		10.1	

表 5-1.elastin の分画

この分子量とデスモシン含有量の違いが増殖と接着に対して影響を及ぼしたと考えられる。Elastin A では E と比較すると、デスモシン含有量[mol%]が多い。デスモシンは elastin の架橋構造であり、含有量が多いことから複雑に折り畳まれた構造であることが示唆される。さらに分子量から elastin A の方が大きな分子であることがわかる。このため立体障害が生じやすく細胞の認識領域である VGVAPG 配列との相互作用が弱まった結果、接着率の低下につながったのではないかと考えられる。

その一方で、elastin A で増殖定数が大きくなる結果が得られた。MSC は接着性の細胞であるため、培養器の底面などと接着することで増殖又は分化といった細胞活動が起こる。しかしこれは先に述べたようなことが起こっているとすると、現在までに最もよく知られているのは elastin の VGVAPG 配列と細胞のエラスチン結合タンパク質 (Elastin Binding Protein:EBP) との相互作用による接着であるが、別の細胞認識配列の存在が示唆される。Elastin A と E を比較すると分子量に約 2 倍の差があり、このため elastin A には存在し、E には存在しないアミノ酸配列があり、これによって elastin 同士であっても増殖、さらには分化に対して影響の違いが生じたのではないかと考えることができる。

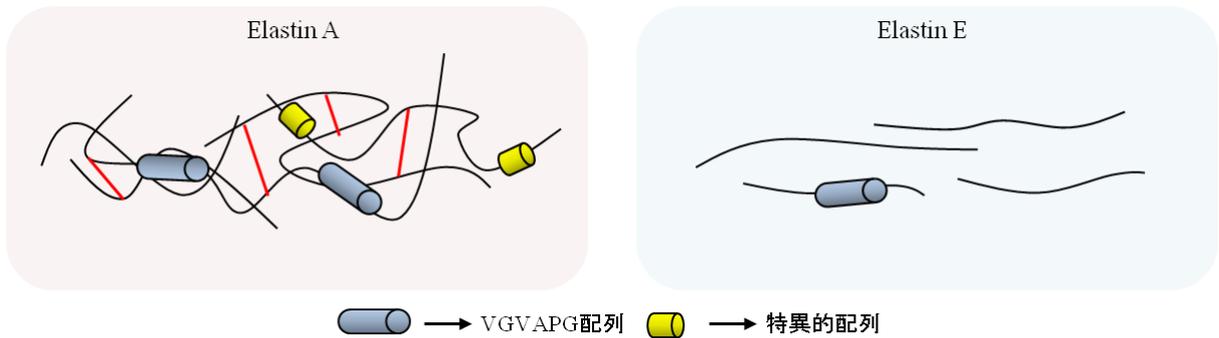


図 5-2.elastin の構造とその配列

5-1-2.type I collagen と elastin

細胞と ECM は膜貫通型の接着タンパク質を介して相互作用を引き起こしている。Collagen と細胞の相互作用はインテグリンを介して結合しており、elastin は先にも述べたように主に EBP を介して結合していると考えられている。この接着に関与するタンパク質の違いにより細胞内に伝わる情報伝達にも違いが生まれ、その結果増殖のみならず、分化に対しても差を生じたと考えられる。

しかし Daniel V.Bax の報告によるヒト真皮線維芽細胞において EBP による接着だけでなく、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを介した接着が報告されている⁴⁰⁾。MSC においても $\alpha_v\beta_3$ の発現は確認されているが、collagen と elastin に対して MSC が発現するインテグリンは異なり、collagen の場合には $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ を発現する⁴¹⁾。よって接着に関与するタンパク質が異なることによる影響が現れたと考えられる。

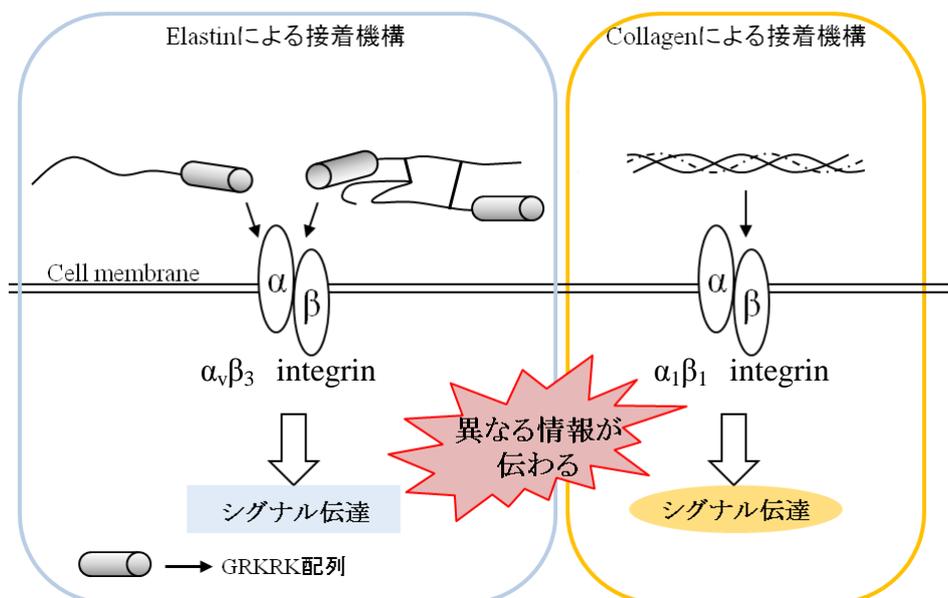


図 5-3.ECM の認識による情報伝達の違い

5-2.ECM ゲル上培養試験

5-2-1.ゲル上での Cytokeratin-18 の発現について

Cytokeratin-18とは、細胞骨格を構成するフィラメント成分の一つである中間径フィラメントであり上皮系細胞に発現が確認されている。Cytokeratin 以外にも神経細胞(ニューロン)ではニューロフィラメント、間葉系細胞ではビメンチンといったような中間径フィラメントが存在する³⁶⁾。このように中間径フィラメントは細胞特異性があると考えられており、そのため間葉系細胞の親細胞である MSC は Cytokeratin を発現しない(図 4-6 a,b)。このことから本実験の結果は type I collagen ゲル上で培養することにより MSC が上皮系細胞へと分化をしていると考えることができる。

現在までに MSC の上皮分化に関して分化すること自体は明らかとなりつつあるが、その詳細なメカニズムは不明である。また本実験のように type I collagen のゲル上でのみ培養をし、上皮への分化を確認した報告もない。そこで本実験で得られた結果から Cytokeratin-18 の発現につながる可能性について考察する。またそのメカニズムの解明の際、この先必要になると考えられる研究の方向性についても合わせて考える。

まず ECM を足場として利用した場合の細胞応答を考える際のアプローチの方法として3つ挙げられる⁴²⁾。1つは化学的特性、つまりECMの組成や架橋構造、またそれとのインテグリン等を介した結合である。2つ目に界面特性、これは足場表面の形状や面の粗さなどが含まれる。そして3つ目に機械的特性である。これは弾性率を始めとした足場の特性である。

5-2-1-1.足場の厚さの影響

本研究では type I collagen ゲルの厚みを変化させて実験を行った。そこでこれらが上皮誘導に関わる可能性について考察する。

用いたゲルの厚さは thick ゲルが~1900 μm 、thin ゲルが~100 μm である。また単分子層コラーゲン coating による厚さは 1~1.5nm である⁴³⁾。このような違いがある中で、Cytokeratin-18 の発現は thick ゲルのみで確認された。また細胞形態や面積においても thick ゲルでのみ変化が見られ、coating と thin ゲルでは変化がなかった。ゲルの厚みに関わらずゲルと培地の界面は同じ構造と考えられるため、MSC と collagen の化学的な認識機序が影響しているとは考え難い。つまり細胞は~100 μm の厚みを物理的に認識できず、それ以上は認識できたことになる。これはゲル底部のプレートからの応力を認識したことに他ならない。それでは基質の歪みはどの程度であろう。Collagen の臨界歪みは5%⁴⁴⁾であり、さらに S.Vanni らによると、細胞による collagen ゲルの崩壊は最大で20%であるという報告がある⁴⁵⁾。また細胞自身にも質量がありそれによる歪みも加わる。よってこれらのことから細胞を播種することによりゲルの厚みが増加したことになる。

る。今回用いたゲルは $\sim 100\mu\text{m}$ と $\sim 1900\mu\text{m}$ であり、ゲルの歪みを20%とすると、実質のゲル厚みは $\sim 80\mu\text{m}$ と $\sim 1520\mu\text{m}$ ということになってしまう。

J.P.Winerらは、fibrinゲル上でhMSC同士の横方向での相互作用の距離が最大で $450\mu\text{m}$ に達すると報告している³⁸⁾。これは細胞が伸長や移動する際に生じる収縮力によるものである。

以上のことから $\sim 80\mu\text{m}$ では十分に下部のプレートから応力を認識することができると推察できる。

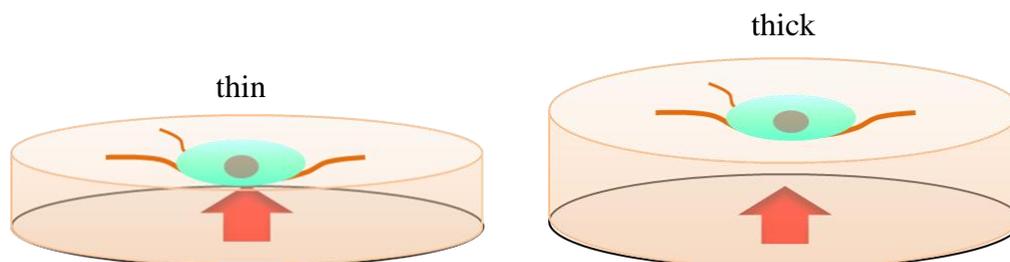


図 5-5.厚さの違いによる底面から応力の受け方

赤矢印が応力を表しており、thinゲルでは細胞まで到達し、thickゲルでは到達しない

5-2-1-3.足場の硬さの影響

次にゲル上での培養はコーティングと比べると足場の硬さが極めて柔らかい。そこでそれが影響を及ぼした可能性について考える。

Guoらなどにより、細胞の遊走やアポトーシス、増殖は足場の硬さに影響されることが報告されている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。これらの報告を基に考えると分化においても影響を及ぼす可能性は十分にあり、細胞種がMSCであることを加味すれば、その多分化能故に足場の硬さに応じた分化を示すことも十分に考えられる。

A.J.Englerらは、厚さが $\sim 70-100\mu\text{m}$ のポリアクリルアミドゲルを利用し、その硬さを0.1、1、10、34kPaに振り分け培養試験を起こった結果、それぞれの硬さに応じてMSCが神経系、筋系、骨系細胞へと分化したことを報告している²⁰⁾。つまり硬さの違いが分化経路を左右することが立証されたことになり、足場の硬さと分化の関係が重要であることが示された。本研究に用いたゲルの圧縮弾性率は3~12kPaである。これはEnglerらの実験と非常に近く、さらにはF-actinを染色した結果と図4-6などの結果を比較するとそちらもかなり似た形態を示した。それにも関わらずタンパク質の発現には違いを生じるものとなった。しかし本結果のCytokeratin-18の発現に関しては上記文献において実験での立証がないことから、この可能性を一概に否定をすることはできない。そのため今後は他の分化マーカーを同時に調査し、その関係性についても明らかにする必要があると考えられる。

また細胞の足場の硬さは細胞形態にとっても重要であると考えられている。細胞の形態変化、つまり細胞が収縮伸長する際に足場との接点に対して収縮力を働かせる。これによって細胞骨格の伸長が起きる。本研究結果、並びに A.J.Engler の結果では柔らかいゲル上でも細胞の伸長が観察された。しかし J.P.Winer らの実験によるとせん断弾性率が 250Pa のゲル上で MSC を培養することにより形態は丸くなり、さらに増殖や分化を行わない休止期になったと報告している⁴⁹⁾。本研究のゲルのせん断弾性率は文献を参考にすると~150Pa である⁵⁰⁾。この違い、つまり細胞形態が及ぼす分化への影響が示唆される。

5-2-1-2.細胞形態の影響

次に細胞の形態変化が影響した可能性について考える。図 4-2 から面積は coating や thin ゲルと比べ thick ゲルでは 1/3~1/2 となったことからその差が顕著に示されている。

細胞の増殖や分化に対して細胞形態がその制御として働くと考えられている。例えば、毛細血管内皮細胞は ECM により変化した細胞形態によりその増殖や分化が制御されること⁵¹⁾、軟骨細胞を 2 次元培養すると軟骨細胞様の表現型から線維芽細胞様の表現型へと脱分化し、ペレットやアガロースを利用し 3 次元培養することで軟骨様の表現型を保つこと³⁹⁾などが報告されている。さらに MSC の分化に関しても McBeath らは細胞形態が変化することで脂肪様と骨芽様の表現型を示すことを報告している⁵²⁾。そのメカニズムとしては Rho/ROCK シグナル経路により細胞骨格である F-actin の重合、脱重合が起こることで形態が変化し、それに応じて MSC の分化が決定されたと考えられている。

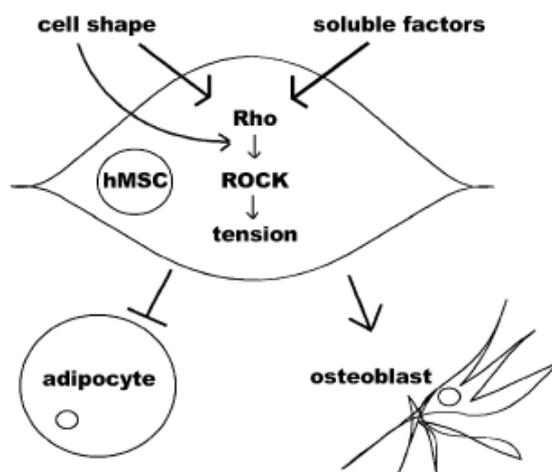


図 5-6.MSC の形態変化による分化⁵²⁾
(McBeath et al.,2004 より転載)

これらのことから考えると図 4-6 で示すように、細胞の伸長が観察されており、これは F-actin の重合が行われている結果であると言える。よって Cytokeratin-18 の発現機構を考える際にはこの Rho/ROCK シグナル経路からの F-actin の重合を経由した機構が重要であることが示唆される。

5-2-1-4.ECM(collagen)の影響

最後に本研究に使用した ECM である collagen の影響についても考える必要がある。Collagen は生体内で最も多く存在する ECM であることなどからこれまでも数々の研究が成されている。さらに MSC の応答に関する研究もこれまでに数多く存在しているが、そのほとんどが骨分化への影響を調査している。そのメカニズムは MAP キナーゼを経由し、その下流に位置する骨分化において発現が確認されている Runx2 遺伝子が活性化し、Alkaline Phosphatase などが発現する¹⁷⁾。しかし本研究では cytokeratin-18 の発現が観察された。Cytokeratin-18 の発現もまた MAP キナーゼを経由すると考えられていることから、type I collagen からのシグナル伝達と一致する。骨分化と上皮分化の関連性については不明確であるが、これらの事実から考えるとシグナル分子が核内に移行した後に骨分化と上皮分化の運命が決定していると考えられる。

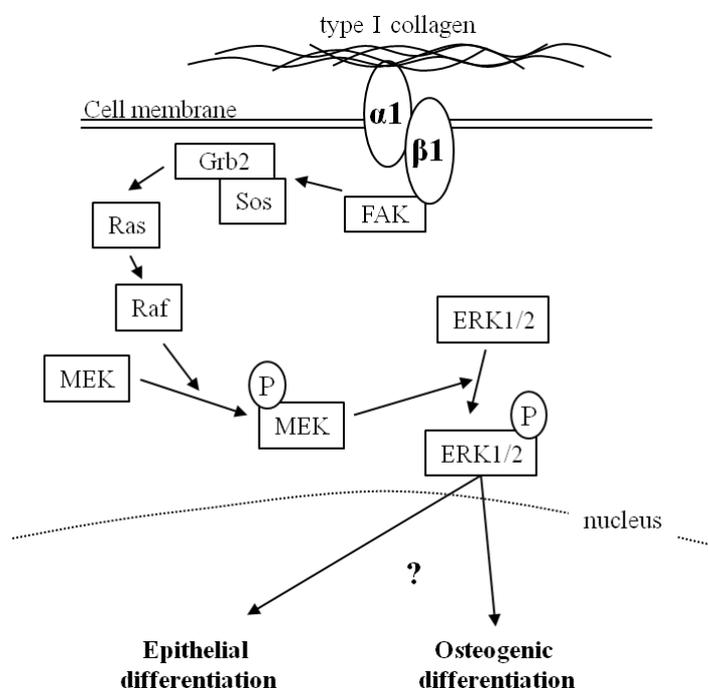


図 5-7.上皮分化と骨分化シグナル

しかし、type I collagen のコーティングにおいて Cytokeratin-18 の発現が見られなかったことや、脂肪分化誘導試験において多分化能の維持が観察されたことから collagen のみが直接的に影響した可能性は低いと言える。そのため先に記述したと合わせて考える必要がある。

以上のことより、本研究で Cytokeratin-18 が発現した理由として collagen のアミノ酸配列に対する細胞応答の影響もさることながら、ゲルの厚みや硬さなどの機械的特性、そしてそれらに応答した細胞の形態による可能性が大きいと考えることができる。

5-3.ゲル上培養での上皮系分化に対する展望

これまでは現在までに報告されていることを基に考察を行った。しかしこれらの可能性を実験的に立証する必要がある。そこでこの先の具体的な方法を述べて ECM を利用した上皮分化誘導技術の確立に対するアプローチについて考察する。

5-3-1.足場の物理的特性

本研究結果から足場の機械的特性が MSC の分化に対して非常に重要な因子となり得ることが示唆された。そこでまずはゲルの厚さに注目する。thin と thick ゲルの厚さを最大・最小値と仮定すると、~1900 μ m 以上のゲルでは同様に Cytokeratin-18 を発現するものと考えられる。よって 100~1900 μ m の厚さのゲルを用いて検証する必要がある。これにより、より詳細な発現の閾値を得ることができる。また厚さのグラデーションのあるゲルを使用する方法を提案する。厚さの異なるゲルをそれぞれに用いるだけでなく、一つのゲルにおいてグラデーションを作製することにより、A.J.Engler の示すような連続的な変化を調査することができ、上皮系への分化とそれに伴う競争的もしくは競合的な他系統への分化を確認することができる。

また厚さのみではなく硬さも重要である。本実験で使用した濃度の異なるゲルの圧縮弾性率はそれぞれ 3kPa と 12kPa と培養シャーレと比べると非常に小さかった。そこでより大きな弾性率のゲルを使用する。これにより厚さだけではなく、足場の硬さを含めた物理的特性による発現の違いについて調査する必要があると考えられる。さらには 5-2-1-3 において細胞形態はこれらの物理的特性との関わりがあり、分化にとって非常に関連性が高いことを述べた。つまりこれらの因子を調査することは細胞形態との関わりを調査することにつながる。柔らかい基質上で丸い形態ではなく、紡錘状を示したことは非常に興味深く、この原因についても調査をする必要があると考えられる。

5-3-2.足場の化学的特性

今回は type I collagen による実験を行ったが、elastin などの他の ECM ゲル上で培養することによっても Cytokeratin-18 が発現する可能性はあると考える。なぜなら上記の物理的特性によつてのみ発現が促されるのであれば、ECM の組成は関係ないからである。そこで elastin を始め collagen を熱変性させたゼラチンなどを利用し、その詳細を明らかにする必要があると考えられる。また本結果と collagen により骨分化を誘導するという報告を合わせると、一つの EMC から MSC の分化経路が一つであるとは限らないことが示唆される。また MAP キナーゼ経路について前述したが、これ以外の経路の存在も窺い知ることができる。そのため Cytokeratin-18 だけではなく、骨分化を始め脂肪や軟骨といった他の分化マーカーを合わせて検証していく必要があると考えられる。

6.結論

本研究における結論を以下にまとめる。

- ① コーティングディスク培養試験において、他の ECM コーティングと比較した場合に elastin A 上での増殖促進効果の傾向が示された。
- ② コーティングディスク培養試験において、脂肪分化誘導から type I collagen と elastin E 上において分化能の維持が確認された。
- ③ ゲル上培養試験において、足場の厚さの違いによる細胞形態の変化が観察された。
- ④ ゲル上培養試験において、厚いゲルを利用することで MSC で cytokeratin-18 の発現が確認された。

以上のことより ECM を適切な条件で利用することで MSC の増殖・分化を制御することが可能であることが明らかとなった。またゲル上での培養が MSC の上皮系への分化誘導技術の確立につながる可能性が示唆された。

7.参考文献

- 1) 田中 順三:再生医療／日刊工業新聞社(2003)
- 2) 横田 崇:再生医学が分かる／羊土社(2002)
- 3) 岡野 栄之:ES 細胞を制御する最新テクニック／羊土社(2005)
- 4) Jenny Caddick.*et al*:Phenotypic and Functional Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Differentiated Along a Schwann Cell Lineage.*Glia*,2006;54(8):840-849
- 5) Martin Brzoska.,*et al*:Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells.*Biochem.Biophys.Res Commun*.2005;330:142-150.
- 6) Jonathan Slack:エッセンシャル発生生物学／羊土社(2002)
- 7) Baer,P.C,*et al*:Conditioned medium from renal tubular epithelial cells initiates differentiation of human mesenchymal stem cells.*Cell Proliferation*,2009;42:29-37
- 8) Haynesworth,S.E,*et al*:Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies.*Bone*,1992;13:69-80
- 9) Gronthos,S.*et al*.:The growth factor requirements of STRO1-Positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro.*Blood*,1995; 85:929-940
- 10) 上野 直人:発生・再生イラストマップ／羊土社(2005)
- 11) 高柳 広:骨研究がわかる/羊土社(2005)
- 12) Shinichi Tsutumi.,*et al*:Retention of Multilineage Differentiation Potential of Mesenchymal Cells during Proliferation in Response to FGF.*Biochem.Biophys. Res. Commun*.2001;288:413-419.
- 13) 山本 雅:シグナル伝達イラストマップ／羊土社(2004)
- 14) Takeuchi Y,*et al*:Differentiation and Cell Surface Expression of Transforming Growth Factor- β Receptors Are Regulated by Interaction with Matrix Collagen in Murine Osteoblastic Cells.*J Biol Chem*,1996;271:2928-2944.
- 15) Hong Xia,*et al*:Focal Adhesion Kinase Is Upstream of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt in Regulating Fibroblast Survival in Response to Contraction of Type I Collagen Matrices via a β_1 Integrin Viability Signaling Pathway.*J Biol Chem*, 2004;279(31):33024-33034.
- 16) C Chandra Kumar.Signaling by integrin receptors.*Oncogene*,1998;17:1365-1373.
- 17) Meyers, *et al*: Modeled Microgravity Disrupts Collagen I/Integrin Signaling During Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2004; 93: 697-707.
- 18) Zayzafoon, *et al*: Modeled Microgravity Inhibits Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells and Increases Adipogenesis.*Endocrinology*,

- 2004; 145: 2421-2432.
- 19) Q.Zheng, *et al*: Could the effect of modeled microgravity on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells be reversed by regulation of signaling pathways? *Biol.Chem*, 2007; 388: 755-763.
 - 20) A.J.Engler.,*et al*:Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification.*Cell*. 2006;126:677-689.
 - 21) V.Vogel.,*et al*:Local force and geometry sensing regulate cell functions.*Nat.Rev. Mol. Cell Biol*.2006;7:265-275.
 - 22) C.S.Chen:Mechanotransduction – a field pulling together?*J.Cell Sci*.2008;121: 3285-3292.
 - 23) G.W.Rebecca:The Role of Matrix Stiffness in Regulating Cell Behavior. *Hepatology*.2008;47:1394-1400.
 - 24) D.E.Discher.,*et al*:Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate.*Science*.2005;310:1139-1143.
 - 25) 新井文用:最新医学／羊土社(2005)
 - 26) Xiao-Dong Chen.*et al*:Extracellular Matrix Made by Bone Marrow Cells Facilitates Expansion of Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells and Prevents Their Differentiation Into Osteoblasts.*J Bone Mineral Res*,2007;22: 1943-1956.
 - 27) W.P.Daley.,*et al*:Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine.*J. Cell Sci*.2008;121:255-264.
 - 28) T.A.Mitsiadis.,*et al*:Stem cell niches in mammals.*Exp. Cell Res*.2007;313:3377-3385.
 - 29) S.K.Nilsson.,*et al*:Osteopontin, a key component of hematopoietic progenitor cells.*Blood*.2005;106:1232-1239.
 - 30) P.Gupta.,*et al*:Structurally specific heparin sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche.*Blood*.1998;92: 4641-4651.
 - 31) U.B.Jensen.,*et al*:The spatial relationship between stem cells and progeny in the basal layer of human epidermis:a new view based on whole-mount labeling and lineage analysis.*Development*. 1999;126:2409-2418.
 - 32) D.P.Leone.,*et al*:Regulation of neural progenitor proliferation and survival by beta1 integrins.*J. Cell Sci*.2005;118:2589-2599.
 - 33) Kateri A.Moore,*et al*:Stem Cells and Their Niches.*Science*,2006;31:1880-1885.
 - 34) Simon Mendez Ferrer.,*et al*:Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche.*Nature*.2010;466:829-836.

- 35) 林 典夫:シンプル生化学/南江堂(2003)
- 36) Bruce Alberts:THE CELL 細胞の分子生物学第3版/Newton Press(1995)
- 37) 那須章仁,*et al*:間葉系幹細胞の分化・増殖制御に関する基礎的研究.三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻,平成20年度修士論文 2009.
- 38) 羽多野 由季子,*et al*:自己組織化型エラスチングルの開発.三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻,平成22年度修士論文 2011.
- 39) 水谷 直紀,*et al*:細胞外基質と動的培養による人工靭帯再生技術の開発.三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻,平成21年度修士論文 2010.
- 40) Daniel V.B.,*et al*:Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRK motif and integrin $\alpha_v\beta_3$.*J Biol Chem*,2009;284:28616-28623.
- 41) Katarina Le Blanc.,*et al*:Immunobiology of Human Mesenchymal Stem Cells and Future Use in Hematopoietic Stem Cell Transplantation.*Biol Blood Marrow TR*,2005;11:321-334.
- 42) Xiao Hu.,*et al*:The influence of elasticity and surface roughness on myogenic and osteogenic-differentiation of cells on silk-elastin biomaterials.*Biomaterials*. 2011;32:8979-8989.
- 43) L.L.Natalia,*et al*:Progression of HCC in Mice Is Associated With a Downregulation in the Expression of Hepatocyte Nuclear Factors.*Hepatology*, 2004;39:1038-1047.
- 44) D.Vader.,*et al*:Strain-Induced Alignment in Collagen Gels.*PLoS ONE*,2009;4:e5902.
- 45) S.Vanni.,*et al*:Internet-based image analysis quantifies contractile behavior of individual fibroblasts inside model tissue.*Biophys.J*,2003;84:2715-2727.
- 46) Guo.W.H.,*et al*:Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues.*Biophys.J*.2006;90:2213-2220.
- 47) Wang.H.B.,*et al*:Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells.*Am.J.Physiol.Cell Physiol*.2000;279:c1345-c1350.
- 48) Hadjipanayi.E.,*et al*:Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness.*J.Tissue Eng.Regen.Med*.2009;3:77-84.
- 49) J.P.Winer.*et al*:Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Become Quiescent on Soft Substrates but Remain Responsive to Chemical or Mechanical Stimuli.*Tissue Eng.Part A*.2007;15:147-154.
- 50) Wen Shing Leong.*et al*:Thickness sensing of hMSCs on collagen gel directs stem cell fate.*Biochem & Biophys Res Commun*.2010;401:287-292.
- 51) Farshid Guilak.,*et al*:Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix.*Cell Stem Cell*,2009;5:17-26.

52) McBeath,R.,*et al*:Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment.*Dev.Cell*,2004;6:483-495.

8.謝辞

本修士論文を作成するに当たり、公私共におきまして適切及び懇切なご指導を賜りました三重大学工学部 分子素材工学科 堀内 孝教授、富田 昌弘教授、宮本 啓一准教授に対しまして、心より感謝致します。また事務員として支えてくださった村上 節子様にも感謝致します。

本研究を進めていく上で使用した間葉系幹細胞を提供してくださった広島大学 加藤 幸夫先生、塩基性線維芽細胞増殖因子を提供してくださった科研製薬株式会社に深く感謝致します。

堀内 孝教授には何事に対しても到らなかった私を最後までご指導頂き感謝の意が絶えません。将来教授よりお教え頂いた多くの知識や考え方を基に、日々成長していきたいと思っております。

宮本 啓一准教授には細胞外マトリックスやその使用に関する知識を始め、多くのご指導を賜り、心より感謝致します。

そして日々の研究室生活に対してお世話になりました方々には実験に関することから日々の他愛のない会話まで密な時間を提供してくださったことに感謝致します。特に研究グループのメンバーである大友 佳子さん、田野 裕美さん、中町 信敏君、北村 早希さん、そして卒業された水本 健先輩、山崎 慎也先輩には不出来な私に対して適切なアドバイスを始めとして、多くのことにおいて助けて頂きました。これからのグループの発展、先輩方のますますのご活躍を願うと共に、お礼を申し上げます。後輩の皆さまには先輩として到らなかった私を公私共に支えて頂きました。

最後になりましたが、3年間苦楽を共にした加藤 真司君、熊澤 雄基君、佐々木 剛君、野口 寛之君、東 洋君、山本 光則君には感謝と敬意を表し謝辞とさせていただきます。

平成 24 年 2 月
堀井貴司

9. Appendix

9-1. 各種溶液の調整

< 使用機器・器具 >

- ・pH METER(D-53/HORIBA)
- ・吸引ポンプ(BR-21B/日機装)
- ・10ml シリンジ(SS-12SZ/TERUMO®)
- ・注射針(NN-2432R/TERUMO®)
- ・MILLEX®GP(SLGP033RS/MILLIPORE)
- ・STERICUP™(SCGVU05RE/MILLIPORE)
- ・ウォーターバス(BT-15/Yamato)
- ・5ml アシストチューブ(70335218019/アシスト)
- ・30ml アシストチューブ(71314271019/アシスト)

< 使用試薬 >

- ・DMEM[Dulbecco's Modified Eagle's Medium](D6046/SIGMA、500ml)
- ・FBS[Fetal Bovine Serum](500ml)
- ・PBS[Phosphate Buffered Saline]
- ・TRYPsin-EDTA SOLUTION(10x)(T4174/SIGMA、100ml)
- ・bFGF[FGF basic]
- ・DTT[Dithiothreitol](1261627/Invirogen、500μl)
- ・PS[Penicillin Streptomycin](P0781/SIGMA)
- ・LG[L-Glutamine](G7513/SIGMA)
- ・2mol/L NaOH aq(196-05635/WAKO、500ml)
- ・5mol/L HCl aq(081-05325/WAKO、500ml)

9-1-1. 培地の調整

< DMEM の調整 >

- ① LGとPSをそれぞれ5mlずつ15mlチューブにまとめた。
 - ② 0.22μmフィルターにて滅菌後、培地に加えた。
- * 細胞培養用は、10%FBSと3ng/ml濃度のbFGFを加えた。

< pH 調整 >

培地のpHが正常値(pH7.35~pH7.40)でない場合、pHの調整を行った。

- ① 酸性側の場合は NaOH aq(1N)を、塩基性側の場合は HCl aq(1N)を添加した。
- ② 添加後、培地全体を 0.22 μ l フィルターにかけた。

<FBS の不活性・分注・保存>

- ① -20 $^{\circ}$ Cにて凍結保存されている FBS を 37 $^{\circ}$ Cのウォーターバスに浸し、振り混ぜながら溶かした。
- ② 完全に溶かし終えたら、数回振り混ぜた。
- ③ 55~56 $^{\circ}$ Cのウォーターバスで 30 分間加熱した。(非動化)
- ④ STERICUPTMにてフィルター滅菌し、30ml チューブに 20~25ml ずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌操作で行った。
- ⑤ -20 $^{\circ}$ Cの冷凍庫にて保存した。

* 血清の非動化について

血清は血液を凝固させてその上澄みをとったもので、様々な細胞増殖促進物質、細胞障害保護因子、栄養因子などが含まれる。血清に含まれる補体成分が活性化されると、細胞に障害を与える場合があるため、血清を 56 $^{\circ}$ Cで 30 分間加熱して補体成分を不活性化させる。

<各 supplement の保存>

•PS[Penicillin Streptomycin]

5ml ずつ分注し、-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

•LG[L-Glutamine]

5ml ずつ分注し、4 $^{\circ}$ Cで保存した。

•bFGF[FGF basic]

2.475ml の 0.1% BSA/PBS 溶液に 0.1M DTT を 25 μ l と bFGF を 25 μ g 加えた後、チューブに分注し、-20~-70 $^{\circ}$ Cで保存した。

9-1-2.TRYPSIN-EDTA SOLUTION の分注、保存

- ① 納品後、凍結(-20 $^{\circ}$ C以下)で保存した。
- ② 5ml アシストチューブに 4ml ずつ分注し、-20 $^{\circ}$ Cにて保存した。

9-1-3.DEPC 処理水の作成

- ① Milli-Q 水を密閉できるガラスビン(500ml メディウムビン)に入れた。
- ② 500ml の Milli-Q 水に対して DEPC を 600 μ l(0.1%)加え、蓋をきっちり締めてよく振り混ぜた。
※DEPC は発癌性があるため、この作業は全てドラフト内で行った。
- ③ そのまま、37 $^{\circ}$ Cのオープン内に入れ、2 時間加温した。30 分に 1 回振り混

ぜた。(DEPC が均一に広がり、全体の RNase が失活する)

- ④ ビンの蓋を充分緩めて、121°C/40 分(1 本あたり 500ml の場合)高圧蒸気滅菌にかけた。

9-1-4.滅菌水の作成

- ① 脱イオン水を密閉できる耐熱ガラスビン(1L メディウムビン)に入れた。
- ② 蓋をきっちり締めた後、滅菌テープで封印し、121°C/40 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

9-2.細胞培養

< 試薬・器具・機器 >

- Phosphate Buffered Saline(PBS)(D-8537/SIGMA)
- セルバンカー(日本全薬工業)
- 25 cm² 培養フラスコ(住友ベークライト)
- Φ35 シャーレ、各種プレート(住友ベークライト)
- 各種遠沈管(Biologix)
- Counting chamber(03-202-1/Erma)
- CO₂ インキュベーター(池本理化工業)
- KUBOTA 2010(RD3132/株式会社久保田製作所)
- Vortex(S-100/TAITEC)
- 恒温槽(BT-15/Yamato)
- ヒト間葉系幹細胞(HMS: human mesenchymal stem cell、Cell No.:0043、Cell name:MSC-R36-2)
- bFGF[FGF basic]
- DMEM[Dulbecco's Modified Eagle's Medium](D6046/SIGMA、500 ml)
- dexamethasone(047-18863/Wako)
- ascorbic acid(012-04802/Wako)
- β-glycerophosphate(171030-22/ナカライテスク)
- indomethacin(095-02472/Wako)
- IBMX[3-isobutyl-1-methylxanthine](15879-100MG/Sigma)
- insulin(193900/Wako)

9-2-1.継代培養

① レインキュベート

目的の培養フラスコ、シャーレ、プレートに選択した培地を入れ、37℃、5%CO₂ インキュベーター内にプレインキュベートした。

② 細胞の洗浄

- 1) 培養フラスコの蓋を開け、口元を加熱殺菌した。
- 2) 滅菌済みパスツールで培養フラスコ内の培養液を吸引した。
- 3) PBS 溶液 10ml/75cm² フラスコを添加し、前後左右に振り洗浄した。
- 4) 滅菌済みパスツールで培養フラスコ内の洗浄液(PBS)を吸引した。

③ 培養細胞の剥離方法

- 1) 融解した Trypsin-EDTA solution 1ml に PBS 9ml を加え、ボルテックスを

かけた(以下トリプシン溶液とした)。

- 2) トリプシン溶液 10ml を 75cm² フラスコに加え、約 30 秒後、ゴムシートの上で 10 回を 2 セット叩いて細胞を剥離させた。
- 3) 顕微鏡で細胞の剥離を確認後、FBS 2ml を 75cm² フラスコに加えた。
- 4) 滅菌済み 10ml ピペットで培養フラスコ内の細胞懸濁液を吸引し、15ml 遠沈管に入れた。
- 5) 50G(800rpm 5 分間 原則 4℃)遠心分離した。
- 6) 遠心分離した上澄み液を 10ml ピペットで吸引し、細胞に培養培地を 3ml 加えて細胞懸濁液を作成した。
- 7) 10 回ピペッティングを行った後、細胞懸濁液(濃度 5×10⁵ cells/ml)を取り、あらかじめ用意しておいた培養フラスコに定量播種した。37℃、5%CO² 条件下でインキュベート培養した。

※細胞懸濁液濃度は血球計算盤にカバーガラスをのせ、その隙間に培養フラスコに播種する直前の細胞懸濁液 3μl を注入した。顕微鏡で細胞数を測定し、細胞懸濁濃度を算出した。1mm² の面積の細胞を数えて、液の厚みを 0.1mm としたときの細胞懸濁液濃度は、細胞測定数×10⁴ cells/ml とした。

9-2-2.培地交換と培地・懸濁液量

<操作>

- ① あらかじめ交換する培養培地を 37℃の温水で温めたものを使用した。
- ② 滅菌済みパスツールで細胞培養培地を吸引した。
- ③ 細胞培養に使用する各容器に対してそれぞれ適量の培養培地を加えた。

表 9-1.各容器に対する培地量と懸濁液播種量目安

容器	培地量	懸濁液播種量
Φ35 シャーレ	2ml	0.2ml
75cm ²	15ml	1ml
6 穴プレート(1 穴)	2ml	0.2ml
96 穴プレート(1 穴)	100μl	10μl
8 穴チャンバー(1 穴)	300μl	50μl
12 穴トランスウェル(1 穴)	0.5ml(apical)-1.5ml(basal)	50μl(apical)

9-3.脂肪分化誘導

< 試薬・機器・器具 >

- Dexamethasone(047-18863/Wako)
- Indomethacin(095-02472/Wako)
- 3-isobutyl-1-methylxanthine(15879-100MG/Sigma)
- Insulin(193900/Wako)
- DMEM(D6046/SIGMA、500 ml)
- 15/50 mL 遠沈管(1-3500-01/アズワン)
- 0.22 μ フィルター(PES030022/大阪ケミカル)
- 10mL シリンジ(SS-12SZ/TERUMO®)
- 注射針(NN-2432R/TERUMO®)

< 準備 >

- A) dexamethasone : 1.95mg を調整済培地 : 5mL に溶解
(濃度 : 3.9×10^{-4} g/mL)
- B) indomethacin : 7.1558mg を調整済培地 : 10mL に溶解
(濃度 : 7.1558×10^{-5} g/mL)
- C) 3-isobutyl-1-methylxanthine : 11.11mg を調整済培地 : 10mL に溶解
(濃度 : 1.111×10^{-3} g/mL)
- D) insulin : 1mg を調整済培地 : 10mL に溶解
(濃度 : 1×10^{-4} g/mL)

*A~D)はそれぞれベンチ内にてフィルター滅菌を行った。

< 培地調製 >

- 1) A)を最終濃度:1 μ M となるように添加した。 *培地量の 0.1%
- 2) B)を最終濃度:0.2mM となるように添加した。 *培地量の 10%
- 3) C) を最終濃度:0.5mM となるように添加した。 *培地量の 10%
- 4) D)を最終濃度:1 μ g/mL となるように添加した。 *培地量の 1%

< 操作 >

- 1) DMEM にそれぞれの溶液を適量添加し、培地を作製した。
- 2) 恒温槽にて 37°C に加温した。
- 3) フラスコ内の培地を抜き、PBS で洗浄した。
- 4) 1)で作製した培地を添加した。

9-4.Oil red O 染色

< 試薬・機器・器具 >

- ・ Oil red O (O0625-25G/Sigma)
- ・ イソプロパノール (291-13/ナカライテスク)
- ・ ホルムアルデヒド(064-00406/Wako)
- ・ PBS (Phosphate Buffered Saline)
- ・ 脱イオン水
- ・ 0.22 μ m フィルター(PES030022/大阪ケミカル)
- ・ 10mL シリンジ(SS-12SZ/TERUMO®)
- ・ 注射針(NN-2432R/TERUMO®)
- ・ 振盪器

< 準備 >

A) Oil red O 染色液

Oil red O : 10mg をイソプロパノール : 2mL に溶解させ、10 分間以上振盪した。

B) 10% ホルマリン/PBS

ホルマリン : 200 μ L と PBS : 1.8mL を混合し、0.22 μ m フィルターにて滅菌した。

C) 60% イソプロパノール

イソプロパノール : 2.4mL と脱イオン水 : 1.6mL を混合し、0.22 μ m フィルターにて滅菌した。

< 操作 >

- 1) Oil red O 染色液(stock solution)を脱イオン水で60%に希釈し、0.22 μ m フィルターで濾過した。

*濾過後は長時間(約 2 時間)空气中にさらすと結晶が析出することがあるので、すぐに使用する。

- 2) PBS:2mL で 2 回洗浄。
- 3) 10% ホルマリン/PBS を 2mL 加えて静置した(4 $^{\circ}$ C、60min)。
- 4) PBS : 2mL で 2 回洗浄。
- 5) 60% イソプロパノールを 2mL 加えて静置した(室温、1min)。
- 6) Oil red O 染色液 : 1.5mL を加えて静置した(室温、15min)。
- 7) 60% イソプロパノール : 2mL を加えて静置する(室温、2min)。
- 8) PBS : 2mL で 2 回洗浄。
- 9) PBS : 2mL を加えて検鏡した。

9-5. 免疫蛍光染色

＜測定原理＞

免疫化学染色は、特定のタンパク質を検出する方法で、各々の細胞の特異的なタンパク質を標識し、それを確認することにより細胞の同定を行う。

特定タンパクに一次抗体を認識させ、さらにその一次抗体を抗原として認識する蛍光物質を標識した二次抗体を用いる。二次抗体には特定の動物種の免疫グロブリンを認識する抗体を利用する。同じ動物種の由来の一次抗体であれば二次抗体が認識可能である。

それぞれの蛍光物質に対応する波長の励起光当て、蛍光を検出する。

(図 9-1)

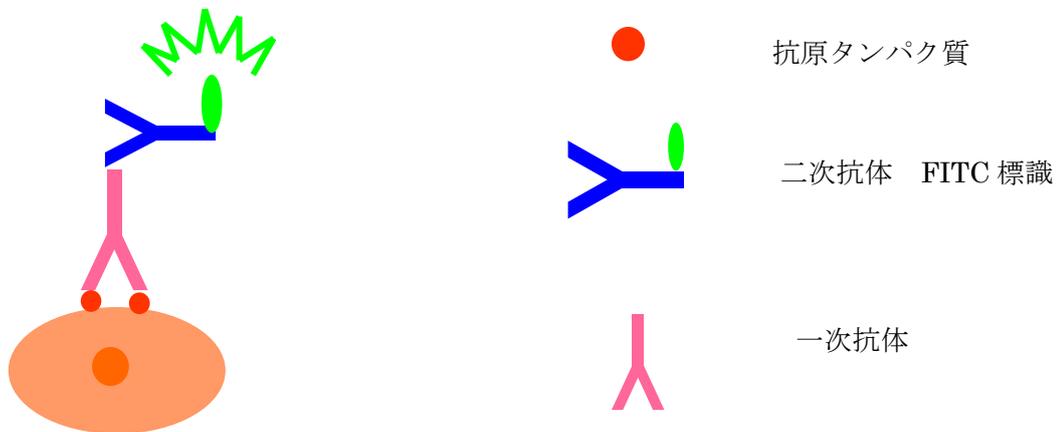


図 9-1. 抗原抗体反応を用いた免疫化学染色

・FITC (fluorescein isothiocyanate)

緑色系の蛍光色素で、この色素は安定で、抗体活性を阻害せず、抗体への標識が容易で安定、蛍光効率が低い、最大吸収波長と最大発光波長がかなり離れているなどの標識用蛍光色素の要件をかなり満たしている。

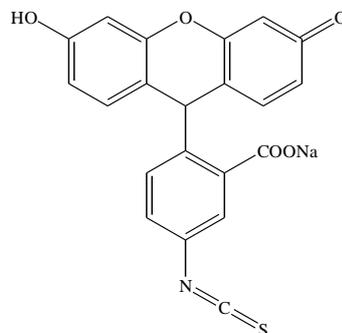


図 9-2.FITC

< 試薬・機器・器具 >

- 共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV1000 倒立顕微鏡 IX81)
- Anti-Cytokeratin-18 phospho Ser52, Rabbit(SC-27932-R/コスモバイオ)
- Goat anti-Rabbit IgG,(H+L) FITC conjugate(AP307F/MILIPORE)
- propidium iodide(PI)(P4170-25MG/SIGMA)
- ホルムアルデヒド (064-00406/Wako)
- PBS
- Triton X-100(T8787-50ML/Sigma)

< 準備 >

- A) ウシ血清アルブミンを PBS に溶解させ 1%BSA/PBS 溶液を作製した。
- B) ホルムアルデヒドと PBS を溶解させ、4%ホルムアルデヒド溶液を作製した。
- C) Triton X-100 を PBS に溶解させ 0.5% Triton X/PBS 溶液を作製した。

< 操作 >

- 1) 細胞がいる 24well plate から培地を取り除き、PBS 洗浄を行った。
- 2) 4%ホルムアルデヒド溶液を加え、rt で 10 分間固定した。
- 3) PBS で洗浄した後、0.5% Triton X-100/PBS 溶液で 10 分間浸透処理をした。
- 4) PBS により 3 回洗浄を行った。
- 5) サンプルに一次抗体(希釈率;抗体:1%BSA/PBS=1:200)を 500 μ l 加え、4 $^{\circ}$ C、飽和湿度で overnight させた。
- 6) 一次抗体を取り除き、1%BSA/PBS 溶液で 3 回洗浄した。
- 7) 二次抗体(希釈率;抗体:1%BSA/PBS=1:200)を 500 μ l 加え、90 分間、rt、暗所で静置した。
- 8) 二次抗体を取り除き、1%BSA/PBS 溶液で 3 回洗浄した。
- 9) 共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

共焦点レーザー顕微鏡

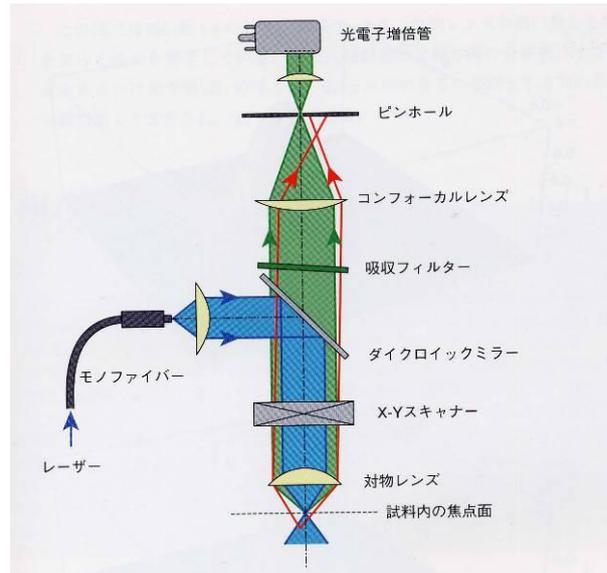
<共焦点レーザー走査顕微鏡の原理>

普通の顕微鏡を使っていると、焦点外のぼけの重なりによるコントラストの低下がしばしば観察の障害になる。高倍率になるとなおさらである。これを解決するのが共焦点レーザー走査顕微鏡である。最大の特徴は、ぼけを排除できること、高倍率でも鮮明な画像が得られ、立体観察も容易である。切片像を無浸襲で得られるので、組織や細胞を生きたまま詳細に見ることも可能である。

原理はシンプルで、その中核になるのは点光源とピンホールの2つである。これらが巧妙に配置されている。

レーザーから出力されたビームは、モノファイバーを通して共焦点顕微鏡に導かれ、点光源として用いられる。その光をレンズによって平行光に変換し、ダイクロイックミラーによって落射照明にされ、対物レンズの試料側の焦点に収束

する。対物レンズの焦点に収束した照明光は、試料の蛍光色素を励起する。そこから発した蛍光を、対物レンズが集めて結像させる。この結合位置にあわせてピンホールを置くと、ピンホールに結像した光が通過し、検出器によって電気信号に変換されたものを観察する。



<使用装置>

- ・ 共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 (OLYMPUS)
- ・ 倒立型顕微鏡 IX81 分光タイプ (OLYMPUS)

[方法]

I システムの立ち上げ

- ① パソコンを ON にした。
- ② レーザーを ON にした。
- ③ モニター上にパスワード入力画面が表示された後、水銀ランプを ON にした。
- ④ ユーザー名・パスワードを入力し WindowsXP へログオン。

User ID: Administrator

Password: fluoview

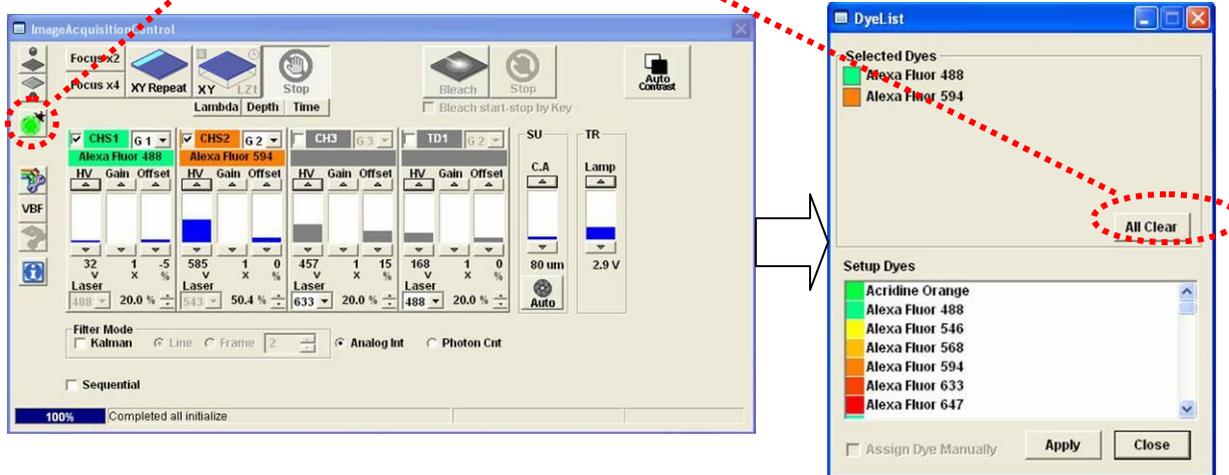
- ⑤  をダブルクリックしユーザー名・パスワードを入力、
FV10-ASW ソフトウェアを起動した。

User ID: Administrator

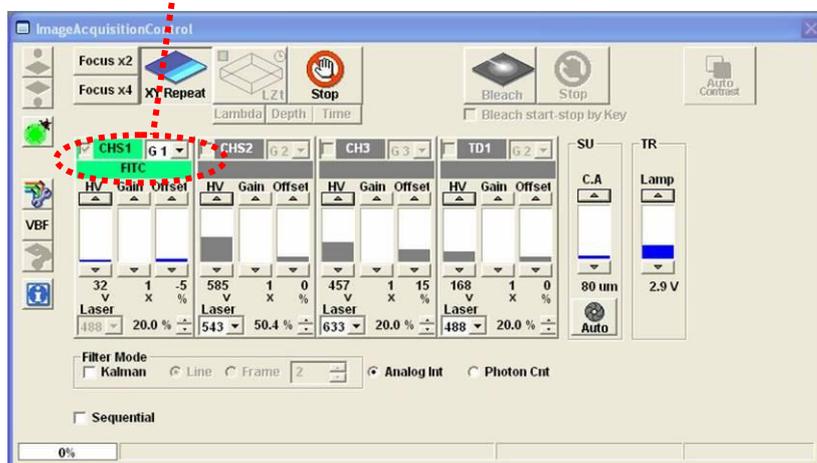
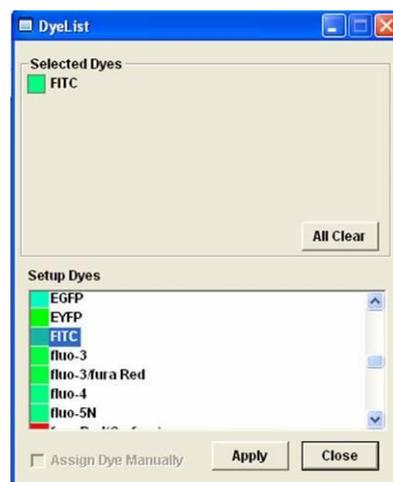
Password: Administrator

II 蛍光試薬選択

- ① DyeList ボタンをクリックし、All Clear ボタンをクリックしリセットした。



- ② DyeList パネルから観察する蛍光試薬を選びダブルクリックした。
- ③ Apply ボタンをクリックして閉じる。
- ④ CHS1 の蛍光試薬が変更したことを確認した。



II 顕微鏡で目視観察

- ① ハンドスイッチで対物レンズを選択した。
(10,20 倍レンズ:ドライ 40,60 倍レンズ:オイルを用いた。)
- ② パソコン上のアイコンをクリックし、ハロゲンランプ、蛍光レーザーの ON、OFF をした。



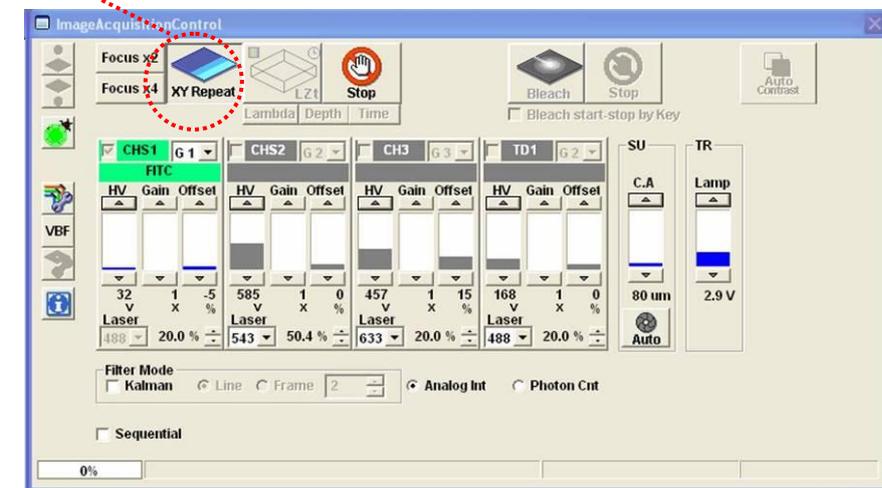
- ③ 顕微鏡手前のフォーカススイッチ等によりピント調節した。

III 画像の取得(試し撮り)

- ① HV の値を 600~680、スキャン速度 8.0us/Pixel、画素数 512by にセットした。

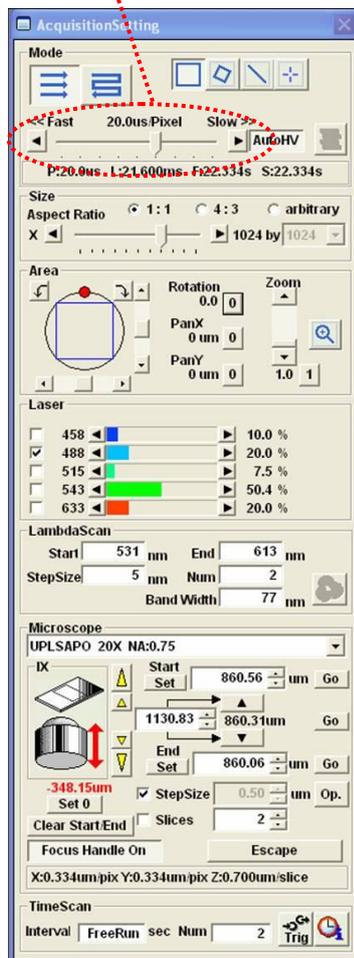
微分干渉像 TD1 の値は HV100 前後にする。
(微分干渉像が不必要の場合はチェックをはずす。)

- ②  をクリックし、画面を見ながらピントを合わせ微調整した。

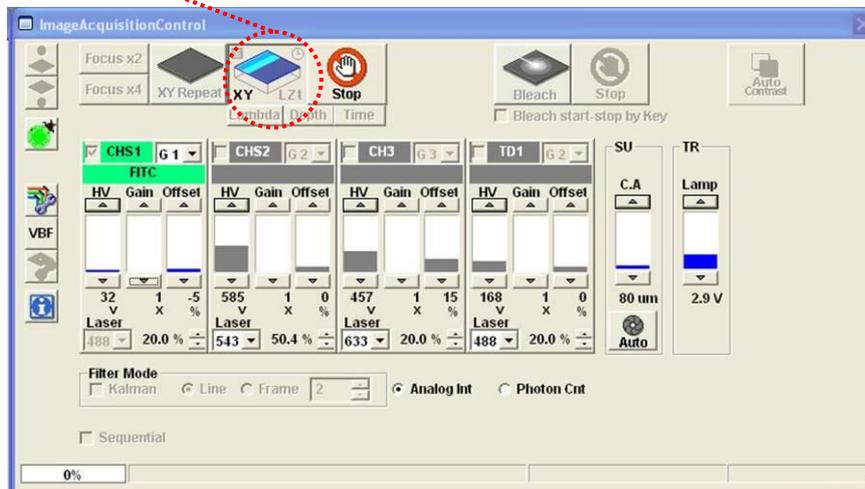


IV 画像の取得(本番)

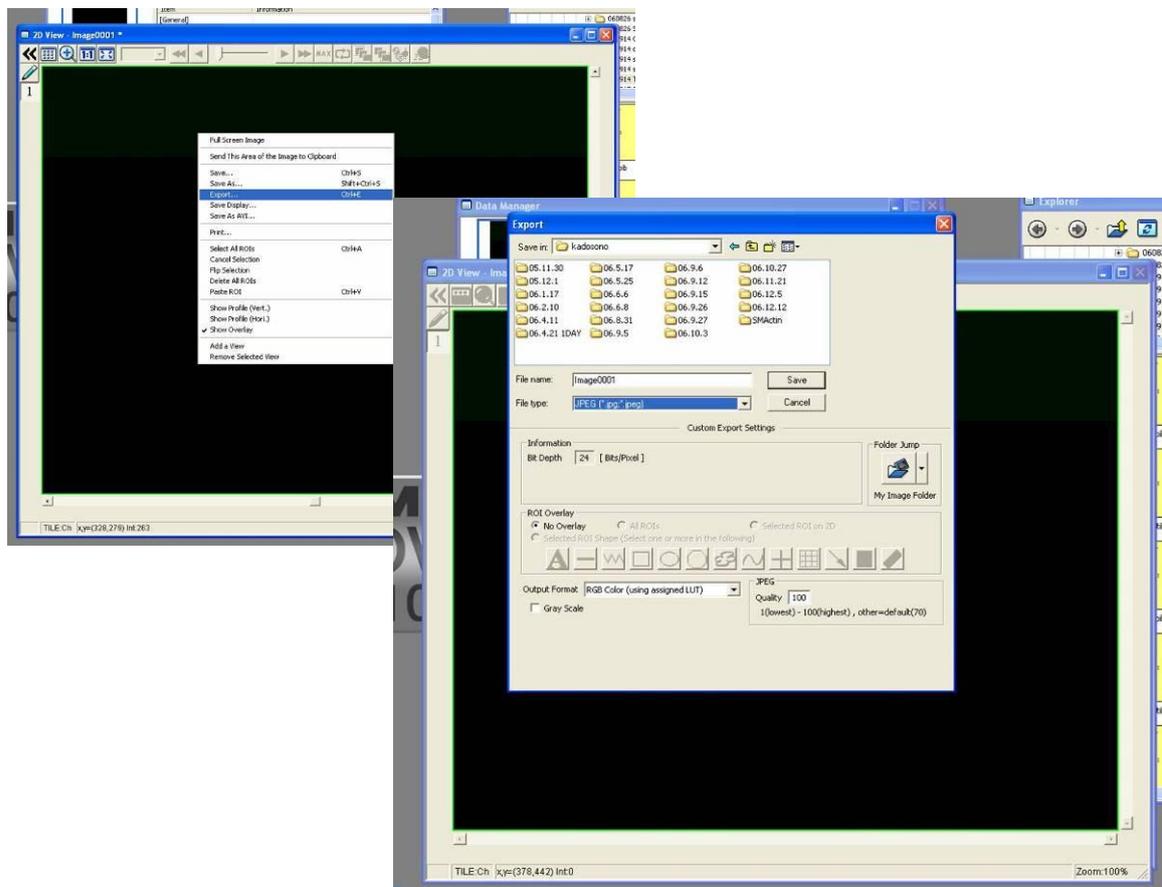
- ① 40.0us/Pixel に設定を変更した。



②  をクリックし、画像を取得した。



③ 取得した画像の上で、右クリックし **Export** を選択、名前をつけて保存した。



V システムの終了

- ① FV10-ASW ソフトウェアを終了した。
- ② WindowsXP を終了した (Start/ShutDown→「ShutDown」を選択)。
- ③ レーザーを OFF にした。
- ④ 水銀ランプを OFF にした。

補足

AcquisitionSetting

Mode
 << Fast 20.0us/Pixel Slow >>
 AutoHV
 P:20.0us L:21.600ms F:22.334s S:22.334s

Size
 Aspect Ratio 1:1 4:3 arbitrary
 X 1024 by 1024

Area
 Rotation 0.0 0
 PanX 0 um 0
 PanY 0 um 0
 Zoom 1.0 1

Laser
 458 10.0 %
 488 20.0 %
 515 7.5 %
 543 50.4 %
 633 20.0 %

LambdaScan
 Start 531 nm End 613 nm
 StepSize 5 nm Num 2

ImageAcquisitionControl

Focus x2 Focus x4 XY Repeat XY LZt Stop
 Lambda Depth Time
 Bleach Stop
 Bleach start-stop by Key
 Auto Contrast

CHS1	G1	CHS2	G2	CH3	G3	TD1	G2	SU	TR				
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	C.A	Lamp								
FITC													
HV	Gain	Offset	HV	Gain	Offset	HV	Gain	Offset					
680	1	0	585	1	0	457	1	15	118	1	0	80 um	2.9 V
V	x	%	V	x	%	V	x	%	V	x	%		
Laser			Laser			Laser			Laser				
488	20.0 %		543	50.4 %		633	20.0 %		488	20.0 %			

Filter Mode
 Kalman Line Frame 2
 Analog Int Photon Cnt

Sequential

向き・角度の調整
 試料を動かさずに撮影可能

デジタルズーム
 対物レンズを換えずに高倍率で観察可能

通常、Offset を 0 にしておく。
 HV だけ値を変える。

単染色ではチェックを入れない。

9-6.ECM コーティングシャーレの作製法

生体細胞は、接着するための足場を必要とする接着細胞と、接着なしに浮遊したまま培養可能な浮遊細胞に分類される。接着細胞は細胞外マトリックス(ECM)に接着することではじめて接着・分化・増殖といった機能を果たすため、接着細胞のECM 上での詳しい解析を行う必要がある。そこで、細胞接着もタンパクの吸着もできない浮遊細胞培養用のシャーレ表面をコロナ放電処理した後に、ECM をコーティングすることで ECM のみの表面を持つシャーレを作製した。

【コロナ放電処理の原理】

シリコン、ポリプロピレン、ポリエチレン等は、その表面層に極性基を持たない為に、接着性、コーティング性、親水性が悪い等の問題があり、その表面を改質する必要がある。コロナ放電表面処理装置は、高周波高電圧を利用し、大気中にコロナ放電を発生させ、それによって生成される官能基と共に、その電子を物質表面に照射することにより物質の表面改質を行うもので、高周波高電圧の気中で、電解内にて起きる、原子、分子、電子、イオン間での衝突により、電子エネルギーの励起、光子の放出が起こる。このコロナ放電のエネルギーを物質の表面で作用させたとき、その表面がエネルギーを受け、表面エネルギーが高くなり活性化された状態(ラジカル生成)になる。そこに空気中の酸素や水分などが反応し、極性をもったさまざまな官能基が表面の濡れ性が向上する。

<浮遊培養用シャーレ>



図 8-10 コロナ放電処理前後のシャーレ表面の様子

<機器・器具>

- ・浮遊培養用 φ35 シャーレ(MS-80240/住友ベークライト)
- ・10mL シリンジ(SS-12SZ/TERUMO®)
- ・Corona Fit(CFG-500/信光電気計装株式会社)
- ・0.22 μm フィルター(PES030022/大阪ケミカル)
- ・50 ml 遠沈管(1-3500-02/アズワン)

<使用試薬>

- ・Elastin A、E(本研究室にて抽出)
- ・滅菌水
- ・type I collagen(本研究室にて抽出)
- ・5 mol/L HCl aq (081-05435/WAKO、500 ml)

<準備>

1. エラスチン溶液の調整

- ① 分画水溶性エラスチンを 50 mg 秤量し、50 ml の滅菌水に溶解させた。
- ② エラスチン水溶液をシリンジで吸引し、0.22 μm フィルター滅菌を行い、冷蔵庫で保存した。

2. コラーゲン溶液の調整

- ① 滅菌水を塩酸により pH 3 に調整した後、0.22 μm フィルターを用いて滅菌し、50 ml 遠沈管に入れた。(4°C 保存)
- ② 3 mg/ml の I 型コラーゲン溶液を①で作成した希塩酸で 3 倍に希釈することで最終濃度 1.0 mg/ml のコラーゲン溶液を作成した。

<操作>

- ① 浮遊培養用 φ35 シャーレの表面を 1 分間コロナ放電した。
- ② 作成しておいたエラスチン水溶液、コラーゲン水溶液をそれぞれ 1.5 ml/φ35 シャーレに添加し、4°C で 5 時間静置した。
- ③ コーティング溶液を吸引後、細胞培養液を 2 ml 添加し、37 °C/5%CO₂ 条件で 15 分間以上プレインキュベートした。
- ④ 細胞懸濁液を播種し、37 °C/5%CO₂ 条件で培養した。

9-7.ECM ゲルの作製法

< 試薬・器具・機器 >

- type I collagen(本研究室にて抽出)
- 1mM HCl 水溶液
- NaOH
- NaHCO₃
- HEPES
- 脱イオン水
- 15/50ml 遠沈管(1-3500-01/アズワン)
- 24 穴プレート(MS-80240/住友ベークライト)
- 0.22 μ m フィルター(PES030022/大阪ケミカル)
- 10ml シリンジ(SS-12SZ/TERUMO®)
- 注射針(NN-2432R/TERUMO®)
- 滅菌ロールバッグ
- セルディスク(MS-92132/住友ベークライト)
- 凍結乾燥機

< 準備 >

滅菌済みコラーゲン作製

- 1) コラーゲン適量を 1mM HCl 適量に溶解させ、最終濃度 0.5mg/ml コラーゲン溶液を作製した。
- 2) 1)で作製した溶液を 0.22 μ m フィルターで濾過滅菌した。
- 3) 完成した溶液を遠沈管に入れ、-20℃で凍結させた。
- 4) 遠沈管のふたを外し、その状態のまま滅菌ロールバッグに封入して凍結乾燥させた。

A 溶液

滅菌済みコラーゲンを 1mM HCl 水溶液に溶解させた。

*冷却下で操作した。

B 溶液

- 1) NaOH:200mg、NaHCO₃:3.0g、HEPES:4.89g に脱イオン水を加え 100ml にメスアップした。
- 2) 0.22 μ m フィルターにより濾過滅菌した。

<操作>

Thick gel

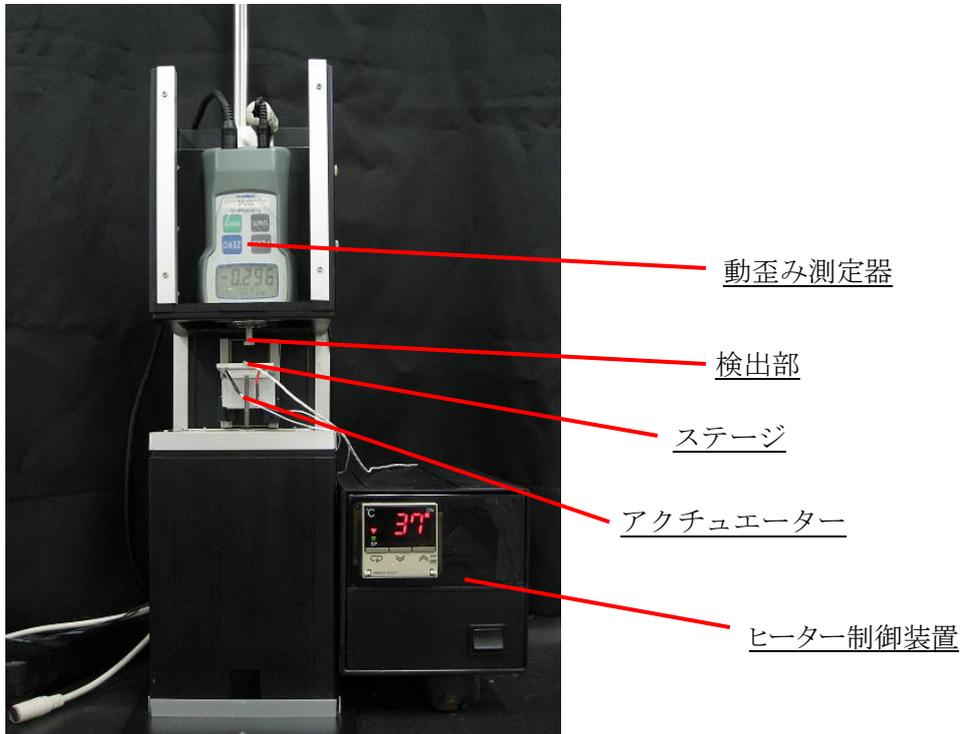
- 1) 冷却下で 24 穴プレートに A:B=1:0.25 の割合で全体量が 350 μ l となるように添加した。
- 2) 37 $^{\circ}$ C インキュベータ内で 1 日間静置した。

Thin gel

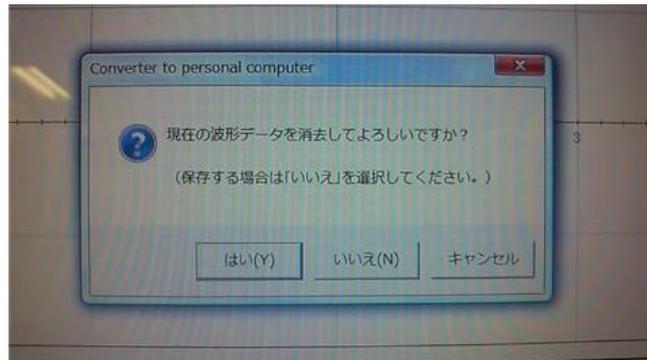
- 1) 滅菌したプレート、鋳型とセルディスクを準備しセットした。
- 2) 冷却下で A:B=1:0.25 となるように溶液を混合し、50 μ l ずつセルディスク上に滴下した。
- 3) プレートにより蓋をし、その状態で 37 $^{\circ}$ C インキュベータ内で 1 日間静置した。

9-8.弾性率測定方法(圧縮試験)

圧縮試験機



- 1) ヒーターを 37°Cになるように設定する。
- 2) 動歪み測定器の POWER を押す。
- 3) Excel:ZaberExcelVBstretchmodulus3 を起動する。
- 4) [Open Com Port and Renumber]をクリックする。
- 5) 全アナログ変換測定器を起動する。
- 6) 第 1 チャンネルにチェックを入れて、空欄に次のように入力した後、[設定]→[はい]をクリックする。
計測器の名称[FG]／信号の種類[±1V]／計測値の名称[F]
計測信号の範囲 min[-1]／max[1]／信号の単位[V]
計測値の範囲 min[-1982.6]／max[1982.6]／計測値の工業単位[mN]
小数部桁数[1 桁]／サンプリング時間[0.1 秒]
- 7) 右下の[スタート]を押し、③で設定した値が読み取られているか、測定値側のアームを軽く押したときにグラフが変化するかを確認した後、[ストップ]を押す。
- 8) もう一度スタートを押し、下図のウィンドウを出す。



- 9) サンプルの自然長(厚み)を測定した後、ステージに載せ、検出部にサンプルが触れるまでステージを上昇させる。
- 10) Zaber~の[Execute Command Sheet]をクリックする。
- 11) [OK]を2度クリックする。
- 12) 8)で出した全アナログ~の[はい]をクリックし、グラフの目盛が表示されるのと同じ時に、Zaber~の[OK]を再度クリックし、測定を開始する。(全アナログ~のウィンドウをずらして[OK]の近くに配置しておくとうり易い)
- 13) サンプルが破断するまで測定を続ける。
- 14) サンプルが破断したら、ESC を押し、アクチュエーターを停止させる。
- 15) 全アナログ~の[ストップ]を押した後、[ファイル]→[ファイル出力]を選択し、Excel: data に保存する。
- 16) Excel: data を起動し、B 列の数値データを全てコピーする
- 17) Excel: 応力歪み曲線を起動し Sheet2 の A 列に(17)でコピーした数値データを[形式を選択して貼り付け]→[リンク貼り付け]で貼り付ける。
- 18) 出力された D 列・E 列をコピーし、Sheet1 の Δl (mm)、F(mN)の欄に張り付ける。
- 19) 9)で測定した自然長 l の値を Sheet1 の指定のセルに入力する。
- 20) 得られた近似曲線の傾きを弾性率(Pa)として記録する。
- 21) サンプルを交換して測定する場合は測定済みのサンプルを取り外し、9)~(20)の工程を繰り返す。

* 破断点を測定する場合は、(1)~(3)は同様の操作である。操作(4)で破断測定 Excel: ZaberExcelVBstretchmodulus3 を起動させる。(5)~(16)までは同様の操作である。

- 22) Excel: data を起動し、B 列の数値データのマイナスになる数字の 1 つ前の数値から全てコピーする。

- 23) Excel:破断点測定テンプレートを起動し、sheet1 の B 列に(17)でコピーした数値データを貼り付ける。
- 24) (9)で測定した自然長を指定のセルに入力する。
- 25) グラフの波形の変化から破断点を読み取る。